

**Immunologische Untersuchungen über
tumorassoziierte Antigene
beim Bronchialkarzinom**

Rudolf Girg

München 1986



Aus der Medizinischen Klinik II Klinikum Grosshadern der
Universität München

Direktor: Professor Dr. Gustav Paumgartner

Immunologische Untersuchungen über tumorassoziierte Antigene
beim Bronchielkarzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rudolf Girs

aus

Erlangen

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Rolf Lamerz

Mitberichterstatter: Professor Dr. Gustav Paumgartner

Dekan: Professor Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.4.1986

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1.	Einleitung und Fragestellung 6
2.	Hauptteil
2.1.	Klinik des Lungenkrebses 9
2.1.1.	Epidemiologie
2.1.2.	Ätiologie
2.1.3.	Makropathologie (Ausbreitung, Stadien) 10
2.1.4.	Histologie 12
2.1.5.	Diagnose 13
2.1.6.	Therapie (Chirurgie, Bestrahlung, Zytostase) 14
2.1.7.	Prognose 16
2.2.	Immunologie, Immundiagnose und -therapie des Lungenkrebses 17
2.2.1.	Sonderfall des Alveolarzellkarzinoms 17
2.2.1.1.	Elektronenmikroskopie
2.2.1.2.	Antigene
2.2.2.	Immuntherapie 17
2.2.2.1.	Levamisole
2.2.2.2.	BCG
2.2.3.	Zelluläres Immunsystem 18
2.2.3.1.	DNCB
2.2.3.2.	PHA
2.2.3.3.	Lymphozyten/Leukozyten
2.2.3.4.	EMT
2.2.4.	Humorales Immunsystem 20
2.2.4.1.	Laktoferrin
2.2.4.1.1.	Eigenschaften
2.2.4.1.2.	Vorkommen
2.2.4.1.3.	Bei Malignomen
2.2.4.1.4.	Beim Lungenkrebs

2.2.4.2.	Ferritin	21
2.2.4.2.1.	Eigenschaften	
2.2.4.2.2.	Vorkommen	
2.2.4.2.3.	Hauptbedeutung	
2.2.4.2.4.	Messung	
2.2.4.2.5.	Bei Malignomen	
2.2.4.2.6.	Beim Lungenkrebs	
2.2.4.3.	Das Alphafetoprotein (AFP)	26
2.2.4.3.1.	Eigenschaften	
2.2.4.3.2.	Vorkommen	
2.2.4.3.3.	Hauptbedeutung	
2.2.4.3.4.	Beim Lungenkrebs	
2.2.4.4.	Das karzinoembryonale Antigen (CEA)	28
2.2.4.4.1.	Eigenschaften	
2.2.4.4.2.	Vorkommen	
2.2.4.4.3.	Hauptbedeutung	
2.2.4.4.4.	Beim Lungenkrebs	
2.2.4.5.	Andere tumorassoziierte und karzinofetale Antigene	32
2.2.4.6.	Nicht identifizierte Antigene beim Lungenkrebs	
2.2.4.7.	Nicht identifizierte Antikörper beim Lungenkrebs	
2.3.	Eigene Untersuchungen	40
2.3.1.	Methodik	
2.3.1.1.	Analytische Verfahren	

2.3.1.1.1.	Eiweissbestimmung	
2.3.1.1.2.	Zweidimensionale Doppeldiffusion nach Ouchterlony	
2.3.1.1.3.	RIA-Markierung, Reinigung, Testung, Standardinhibition: AFP, CEA, Ferritin-IRMA und eigener RIA	
2.3.1.1.4.	Berechnungen	49
2.3.1.2.	Präparative Verfahren	52
2.3.1.2.1.	Gewebeextraktion	
2.3.1.2.2.	Zentrifugieren	
2.3.1.2.3.	Dialyse	
2.3.1.2.4.	Konzentrierung	
2.3.1.2.5.	Ultrafiltration	
2.3.1.2.6.	Lyophilisation	
2.3.1.2.7.	Säulenchromatographie: Gelfiltration, DEAE-Zellulose, Immunadsorption und Absorption	56
2.3.1.3.	Herstellung von Antisera	60
2.3.1.3.1.	Immunisierung	
2.3.1.3.2.	Absorption	
2.3.1.3.3.	Reinigung	
2.3.2.	Untersuchungsmaterial	63
2.3.2.1.	Lungengewebe (Histologie, Stadium, Operation, Sektion)	
2.3.2.2.	Patientensera (Histologie, Stadium, Alter, Geschlecht, Verlauf, Operation)	68
2.4.	Eigene Ergebnisse	70
2.4.1.	Gewebeextraktion (LCES, LCEAS, LCEP, NLE, LCEN)	
2.4.2.	Säulenchromatographie (Elutionsprofile: Sepharose 6B, Sephadex G 100 und 200, DEAE-Zellulose, CNBr.-aktiv.-Sepharose 4B)	76

2.4.3.	Antiseren (Immunisierung der Kaninchen, Doppel- diffusion, Absorption, Reinigung)	
2.4.4.	Lungenkarzinom-assoziierte Antigene	
2.4.4.1.	LCAA-1 (Ferritin) Doppeldiffusion mit Fraktionen der Gelfiltration, Immunoelektrophorese, DEAE-Zellulose, Immun- adsorption und -absorption, RIA: Markier- ung, Antikörperverdünnungskurve, Gelfiltra- tion, Standard-Inhibitionskurve, Pipettier- schema, Auswertung	88
2.4.4.2.	LCAA-2 (Laktoferrin) Doppeldiffusion, Säulenchromatographie, Immun- Elpho	97
2.4.4.3.	LCAA-3 (CEA-BC) Gelfiltration, Doppeldiffusion, Immunadsorption, -absorption, RIA: Markierung, Reinigung, AK-Ver- dünnungskurve, Standard-Inhibitionskurve, Ver- gleich mit CEA-CO, Auswertung	99
2.4.4.4.	LCAA-4 (NCA) Gelfiltration-Doppeldiffusion, Immunadsorption, Immunabsorption	111
2.4.4.5.	LCAA-5 Gelfiltration-Doppeldiffusion, Reinigung	114
2.4.4.6.	Ändere Antigene alpha ₁ -Chymotrypsin	117
2.4.5.	Serumbestimmung	120
2.4.5.1.	Normalkollektiv (AFP, CEA, Ferritin)	145
2.4.5.2.	Vergleichskollektiv (Benigne Lungenerkrank- ungen)	146
2.4.5.3.	Patienten mit Bronchialkarzinom	
2.4.5.3.1.	Altersverteilung	
2.4.5.3.2.	Alpha-Fetoprotein	
2.4.5.3.3.	Carcinoembryonales Antigen (Vergleich: Kolon/ Lunge-CEA)	147
2.4.5.3.4.	Ferritin	152
2.4.5.3.5.	Multivariate Prüfungen	153
2.4.5.3.6.	Verlaufskontrollen	153

2.4.5.3.6.1.	CEA	
2.4.5.3.6.2.	Ferritin	155
2.5.	Diskussion	159
2.5.1.	LCAA-1 (Ferritin)	
2.5.2.	LCAA-2 (Laktoferrin)	172
2.5.3.	LCAA-3 (CEA)	179
2.5.4.	LCAA-4 (NCA)	190
2.5.5.	Weitere Antigene	195
2.5.5.1.	Andere bekannte Antigene	
2.5.5.2.	Andere neue Antigene	198
3.	Zusammenfassung	205
4.	Literaturverzeichnis	210
5.	Danksagung	251
6.	Lebenslauf	252

Einleitung

Das Bronchialkarzinom gilt heute als der häufigste Tumor beim Mann (Inzidenz in den USA 59/100 000, 11/ 000 Neuerkrankungen/Jahr) und als der zweithäufigste Tumor bei der Frau nach dem Mammakarzinom mit ca. 30 000 jährlichen Todesfällen in der Bundesrepublik (237). Ätiologisch sind ca. 90 % der Erkrankungen direkt auf das Zigarettenrauchen zurückzuführen. Wegen der allgemein begrenzten therapeutischen Möglichkeiten (Operation, Bestrahlung, Chemotherapie) und der oft späten Entdeckung des Tumors (bei Diagnosestellung rund 50 % inoperabel) ist die Prognose als ausgesprochen schlecht anzusehen: Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt für alle Fälle 7 %, für inoperable Fälle 0 % und für vermeintlich kurativ resezierte 20 % (237). Prognostisch wichtige Faktoren sind neben der frühzeitigen Entdeckung (Anamnese, Labor, Röntgen-Thorax -Tomographie, -CT, Sputumzytologie, Bronchioskopie, Biopsie) die Histologie (kleinzellige - nicht kleinzellige Karzinome), der Grad der Ausbreitung des Tumors (Stadium) und der Allgemeinzustand des Patienten.

Im Rahmen der Tumorfahndung besteht seit langem von klinischer Seite der Wunsch nach labormäßig faßbaren Substanzen, die direkt oder indirekt auf einen Tumor hinweisen können und die heute als Tumormarker bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um Substanzen von Protein-, Lipid- oder Kohlenhydratcharakter, die als antigenartige Bestandteile in oder auf Tumorzellen vorkommen oder in der Umgebung des Tumors induziert werden und oft als zirkulierende Antigene in Körperflüssigkeiten abgegeben werden. Dabei sollen sie im hohem Maß mit der Entstehung, dem Wachstum und der therapiebedingten Tumorverkleinerung korrelieren. Eine fruchtbare Hypothese für die immunologische Tumorforschung war die Vorstellung, daß Krebszellen sich in ihrem Antigenprofil von ihrer normalen Umgebung durch das Fehlen,normaler,

Wiederauftreten ontogenetisch alter oder ortsfremder bzw. durch das Auftreten neuer Antigendeterminanten unterscheiden und daß der Unterschied von einem intakten Immunüberwachungsmechanismus des Patienten erkannt und durch einen immuntherapeutischen Angriff die Tumorzellen eliminiert werden können (149 a). Ein Teil der beim Menschen entdeckten tumor-assoziierten Antigene konnte auch als zirkulierende Tumormarker nachgewiesen werden wie z.B. als biosynthetisch aberrierende Vorstufen normaler Antigene (z.B. Blutgruppensubstanzen), ekto-
 pisch gebildete normale Antigene (z.B. Hormone) oder ontogenetisch alte reaktivierte Antigene (z.B. onkofetale Antigene). Die meisten heute etablierten Tumormarker wurden mittels polyklonaler Antikörper nach Immunisierung von Tieren mit Tumorextrakten entdeckt und haben bis heute ihre klinische Bedeutung behalten. In neuer Zeit wurde auch die Hybridomtechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper eingesetzt, d.h. Antikörper gegen eine einzelne Antigendeterminante (Epitop). Damit wurden neuere zum Teil noch nicht identifizierte und eher selten zirkulierende Antigene entdeckt, die bisher nur in einigen wenigen Fällen klinische Bedeutung erlangt haben. Die meisten heute bekannten Tumormarker sind weniger tumorspezifische als vorwiegend tumorassoziierte Antigene, die überwiegend nicht mit einem einzigen sondern mit verschiedenen Tumoren und bis zu einem gewissen Grade auch mit benignen Erkrankungen korreliert auftreten könne. Eine interessante Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten von Antikörpern gegen Tumormarker stellt die Immunszintigraphie dar, d.h. die szintigraphische Aufspürung okkultter Tumormetastasen oder -rezidive mittels radiojod-markierten poly- oder monoklonalen Antikörpern gegen einzelne Tumormarker. Ferner ist für die Zukunft erfolgversprechend der Versuch einer spezifischen Immuntherapie mittels monoklonaler Antikörper. Während die Immunszintigraphie immerhin schon in einzelnen Zentren als etabliert gilt, fehlt für die spezifische Immuntherapie noch eine breite Anwendung und ein überzeugender Beweis für eine langfristige Effektivität und eine überlegenere Wirksamkeit im Vergleich zur Kombinationschemotherapie.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach einem oder mehreren Tumorassoziierten Substanzen in Bronchialkarzinomen durch

- a) Herstellung verschiedener möglichst schonender differenter Tumorgewebsextrakte aus Plattenepithelkarzinomen;
- b) Immunisierung von Kaninchen mit diesen Extrakten sowie deren chromatographierten Unterfraktionen zur Herstellung von Antiseren;
- c) immunologische Untersuchungen mit den mit Normalsubstanzen absorbierten Antiseren auf ausschließlich oder Überwiegend in den Tumorextrakten vorkommende Substanzen sowie deren immunaffinitätschromatographische Reinigung bzw. Isolierung und mögliche Identifizierung;
- d) Entwicklung einer hochempfindlichen radioimmunologischen Nachweismethode für gefundene und möglicherweise erfolgversprechende Substanzen;
- e) Einsatz solcher Radioimmunoassays für Serumbestimmungen in einem definierten Patientenkollektiv mit Bronchialkarzinom im Vergleich zu einem Kollektiv mit nicht malignen Lungenerkrankungen und einem Normalkollektiv sowie Vergleich der erhaltenen Befunde mit denen eines etablierten Tumormarkers mit nur geringer Bedeutung für das Bronchialkarzinom (Alpha-Fetoprotein).

2. Hauptteil

2.1. Klinik des Bronchialkarzinoms

2.1.1. Epidemiologie: Die häufigste Krebsform bei Männern jenseits des 40. Lebensjahres ist das Bronchialkarzinom. Das Geschlechtsverhältnis von Männern zu Frauen ist 9:1. In der Bundesrepublik Deutschland starben 14 251 Männer gegenüber 2428 Frauen im Jahre 1962 an einem Bronchialkarzinom. (Piper 207). 1981 lag die Zahl der männlichen Todesfälle schon bei über 24 000 (Schettler 231). Im selben Jahr gab es in der USA 117 000 Neuerkrankungen, das sind 59 pro 100 000 Einwohner, für die Bundesrepublik Deutschland gilt die Zahl 53 und 7, Männer im Vergleich zu Frauen, für das Jahr 1967 (Hornbostel 115) (UICC 237). Somit verzeichnete der Lungenkrebs eine enorme Häufigkeitszunahme. Während er 1920 noch 5%, 1930 schon 12%, 1960 sogar schon über 20% aller Krebserkrankungen ausmachte, so steht das Bronchialkarzinom mit jetzt ungefähr 25% zusammen mit dem in der Häufigkeit abnehmenden Magenkarzinom an der Spitze der menschlichen Krebsstatistik. Beim Mann macht der Lungenkrebs schon 50% der Karzinome insgesamt aus. Betroffen sind vor allem Männer im Alter zwischen 50 und 60 Jahren. Bei Eder wird die Geschlechtsverteilung von Männern zu Frauen mit 4:1 angegeben. Die immense Zunahme des Lungenkarzinoms ist auf die beiden histologischen Typen des kleinzelligen und des epidermoiden Karzinoms zurückzuführen, während das Adenokarzinom, das vor allem Frauen betrifft, kaum ein vermehrtes Auftreten zu verzeichnen hat. (Eder 056). Diese Zahlen dokumentieren eindrücklich den hohen Stellenwert, der der Forschung auf diesem Gebiet einzuräumen ist.

2.1.2. Zur Ätiologie ist zu sagen, das Radium, Chromat, Nickel und Asbest nach langer Expositionszeit und einer Latenzzeit von 20 bis 30 Jahren Lungenkrebs auszulösen im Stande sind. Die Hauptrolle allerdings spielen die kanzerogenen Stoffe, wie Benzpyren, Diäthylnitrosamin und andere. Diese Stoffe entfalten durch die fortschreitende Luftverschmutzung immer größere Wirkung.

Starke Zigarettenraucher erkranken 25 mal häufiger an Lungenkrebs als nicht rauchende Personen. Die Zahlenverhältnisse bei Männern sind 220 zu 3,4 auf 100 000 Todesfälle. Bei den Nichtraucher ist der Städter um den Faktor 10 mehr gefährdet als der Landbewohner, während dieser geographische Unterschied bei den starken Rauchern kaum ins Gewicht fällt.

Marbrenkrebs sind solche Karzinome, die auf dem Boden einer alten Tuberkulose, eines Traumas oder rezidivierenden Pneumonie entstehen. Ihr Anteil wird mit 20% angegeben.

Die Silikose beinhaltet kein größeres Risiko der Krebsentstehung, dies ist aber wohl der Fall bei der Asbestose.

(Eder 056).

Zwei Differenzierungswege sind pathogenetisch denkbar: Eine direkte Umwandlung oder der Weg über ein metaplastisches Stadium. Das Bronchialepithel ist Ausgangspunkt des Plattenepithel- und des kleinzelligen Karzinoms, daneben kommen noch Alveolarepithel und seromuköse Drüsen als Entstehungsort in Frage. (Eder 056).

2.1.3. Nach lage und Ausbreitung lassen sich drei Tumorformen unterscheiden: Erstens das hilusnahe (zentrale) und auch häufigste Lungenkarzinom, das meist kontinuierlich wächst und schnell die Lymphknotenstationen erreicht. Zweitens das periphere Lungenkarzinom, das schnell in die Pleura einwächst und sogar als sogenannter "Pancoast-Tumor" darüberhinausgeht. Er infiltriert Gefäße und Nerven am Hals, auch die Brustwand wird betroffen. Aus diesem Grunde treten Symptome wie Einflußstauung am Hals, Armplexusstörungen und die Horner'sche Trias auf. Drittens das diffus wachsende Lungenkarzinom mit seinen drei verschiedenen Formen. Der Lungenkrebs mit Krebspneumonie, die Lungenmetastasen eines anderen malignen Organtumors mit pneumonischer Ausbreitungsform und schließlich das primäre Alveolarzellkarzinom zählen hierzu. Die letzte Variante findet eine Parallele bei Schafen. Sie wird dort "Hetzseuche" genannt und ist auf eine Virusinfektion zurückzuführen. (Eder 056).

Die Stadieneinteilung gliedert sich wie folgt:

Stadium I - Der Tumor mißt weniger als drei Zentimeter im Durchmesser, die Hiluslymphknoten sind befallen oder nicht (A oder B).

Stadium II - Der Tumor ist größer als drei Zentimeter und die Hiluslymphknoten sind befallen.

Stadium III - Es liegt eine Invasion des Mediastinums oder der Brustwand vor.

Stadium IV - Fernmetastasen haben sich gebildet.

Eine andere Art der Einteilung erfolgt nach dem TNM-System, dies setzt sich immer mehr durch: (Held 110)

- T 0 - Es ist kein Primärtumor erkennbar
- T 1 - Ein Segmentbronchus ist betroffen
- T 2 - Ein Lappenbronchus ist befallen
- T 3 - Ein Hauptbronchus (mehrere Lappen) ist betroffen
- T 4 - Die ganze Lunge ist erkrankt
- N X - Lymphknotenbeteiligung im Thorax ist fraglich
- N 0 - Lymphknoten sind frei von Tumorausbreitung
- N 1 - Lymphknoten sind befallen
- M 0 - Fernmetastasen sind nicht nachweisbar
- M 1 a - Im Pleuraerguß finden sich maligne Zellen
- M 1 b - Halslymphknoten sind tastbar
- M 1 c - Andere Fernmetastasen wurden gefunden

Die Metastasierung des Bronchialkarzinoms erfolgt vor allem in Gehirn, Nebennieren und Skelettsystem, hier meistens in die Wirbelsäule. Weitere Metastasenorgane sind mit abnehmender Häufigkeit Leber, Nieren, Schilddrüse und Pankreas. Es geschieht oft, daß der Primärtumor kaum Symptome macht und erst die Metastasen den ersten auffälligen Hinweis auf ein Tumorgeschehen bringen. Damit ist die Prognose aber meistens

schon infaust. Eine Behandlung hat in dieser Situation nurmehr palliativen Charakter.

Bei lymphogener Aussaat kommt es zu Lungenödem und Pleuraerguß. Die Lymphangiosis carcinomatosa führt auf der Pleuraoberfläche und entlang der Lungensepten zu fortschreitender Lungenstarre.

Die hämatogene Aussaat erfolgt über das Hohlvenensystem oder indirekt über den Ductus thoracicus und macht zahlreiche kleine miliare tuberkuloseähnliche Herde, die später zu runden Tumorknoten auswachsen. Wichtige Komplikationen sind Nekrosen, Blutungen, Ventilationsstörungen, Pleuraergüsse und Cor pulmonale, selten auch einmal eine Polyglobulie.

Die häufigsten Metastasen in die Lunge setzen Osteosarkome, hypernephroide Nierenkarzinome und Chorionepitheliome (hier

in etwa 75 % der Fälle). Schilddrüsen- und Mammakarzinome und die malignen Melanome siedeln sich in 50 % der Fälle in der Lunge ab. Daneben seien noch erwähnt Karzinome von Magen, Pankreas, Leber, Prostata, Mundhöhle, Gebärmutter und Eierstöcken.

Bei der Lymphogranulomatose (Morbus Hodgkin) entstehen manchmal klein- und grobknotige Herde oder auch pneumonieartige Lungeninfiltrate, die eine zunehmende respiratorische Insuffizienz bewirken.

2.1.4. Die Einteilung in histologische Typen geschieht folgendermaßen:

Der häufigste Typ ist das kleinzellige Bronchialkarzinom (Haferzellkrebs, oat-cell-carcinoma), es metastasiert schnell, zerfällt leicht nekrotisch, wird wegen seiner Kleinheit erst spät entdeckt und hat damit eine sehr schlechte Prognose. Der Anteil an der Gesamtheit liegt bei 50 %.

Das Plattenepithelkarzinom ist höher differenziert und wächst langsamer. Deswegen sieht man dieses Karzinom eher als Operationspräparat denn als Sektionspräparat wie das Haferzellkarzinom. Die Plattenepithelkarzinome lassen sich nochmals in verhornende und nicht verhornende unterteilen. Erstere haben eine bessere Prognose, letztere kommen aber häufiger vor. Diese Form ist mit 40 % an der Gesamtheit beteiligt.

Mit nur 7 % ist das Adenokarzinom ein nur seltener Vertreter. Es ist hochdifferenziert und wächst vergleichsweise langsam.

Das sogenannte Alveolarzellkarzinom ist eine besondere Form eines papillären Adenokarzinoms.

Bronchialadenom und Karzinoid der Lungen sind langsam wachsende Tumore, welche die Bronchien verschließen könne, wodurch sie in einem frühen Stadium auffällig werden. Letztere produzieren auch Serotonin und Kallikrein, ähnlich wie das Darmkarzinoid.

In diesem Zusammenhang sind noch die paraneoplastischen Syndrome erwähnenswert: Kleinzellige Bronchialkarzinome bilden mitunter ACTH, es kommen Hyperkalzämiesyndrome und paraneoplastische Endokrinopathien anderer Art vor. (Eder 056)

2.1.5. Die Diagnostik des Bronchialkarzinoms gestaltet sich sehr schwierig und kommt in den meisten Fällen bisher zu spät. Husten ist als unspezifisches Zeichen kaum verwertbar, Bluthusten tritt erst bei fortgeschrittener Krankheit auf. Röntgen und Zytologie konnten diese Situation nicht entscheidend verbessern.

In New York wurden 1977 im Rahmen einer Studie (Melamed 172) zigarettenrauchende Männer im Alter über 45 Jahren untersucht. Einmal jährlich wurde die Lunge in zwei Ebenen geröntgt, zusätzlich wurden die Hälfte aller Männer alle drei Monate hinsichtlich maligner Zellen im Sputum untersucht. Bei einer Ge-

samtheit von 6612 Personen ergaben sich 11 Frühfälle der Stadien 0 und I und 15 Spätfälle der Stadien II und III. Drei Fälle von Kehlkopfkrebs wurden mittels Zytologie hierbei auch noch entdeckt.

Eine Untersuchung aus dem Jahre 1978 in der DDR (Wilde 257) ergab einen Anteil von 26,8 % für Patienten, bei denen noch eine kurative Resektion möglich war. Voraussetzung hierfür war ein jährliches Schirnbild, war dies nicht der Fall und wurde der Verdacht auf Lungenkrebs durch Anamnese und Untersuchung allein nahegelegt, so sank die Rate der noch möglichen Operationen auf nur 5,5 %. Die Fünfjahresheilung ergab dann für die erste Gruppe 12 % und für die zweite nur noch 1,8 %. Die Sputumzytologie erwies sich bei dieser Studie als ziemlich unwirksam und zu teuer im Vergleich zu den erzielten Ergebnissen. Bei Resektion im Stadium I betrug die Heilungsquote 50 - 60 %, es waren sogar 70 %, wenn der Primärtumor kleiner als zwei Zentimeter war. Die Heilungsziffern insgesamt betrugen in der DDR 4,8 % bei Männern und 7,8 % bei Frauen. Wilde gibt dabei einen Weltdurchschnitt von 5,5 - 9,4 % an.

2.1.6. Außer der chirurgischen Therapie wird noch die Chemotherapie und die Bestrahlung zur Bekämpfung des Bronchialkarzinoms eingesetzt. Zusätzlich versucht man das Immunsystem unspezifisch zu verstärkter Abwehr anzuregen.

20 % der Bronchialkarzinome sind bei ihrer Entdeckung noch lokal begrenzt, 30 % haben sich lokal ausgebreitet bis in die regionalen Lymphknotenstationen und 50 % haben schon Fernmetastasen gesetzt.

Die Operation ist in 30 % der Fälle noch möglich, davon überleben 25 % der operierten Patienten die ersten fünf Jahre.

Die Heilungsquote aller diagnostizierten Fälle beträgt aber nur 7%. Ohne chirurgischen Eingriff leben die Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom nur noch drei Monate, die Patienten mit Plattenepithelkarzinom haben unter diesen Voraussetzungen noch sechs Monate zu leben.

Durch Chemotherapie kommen 60 % der kleinzelligen Karzinome, 50 % der Adenokarzinome und nur 30 % der Plattenepithelkarzinome in eine Remissionsphase. Diese dauert aber im Schnitt nicht länger als drei Monate, nur bei einem Viertel beträgt sie mehr als sechs Monate.

Die Bestrahlung verlängert die Überlebenszeit kaum, weil die Fernmetastasierung das Limit setzt. (Hadorn 099)

Die drei wichtigsten Zytostatika bei der Bekämpfung des Lungenkrebses sind Adriamycin, Zyklophosphamid und Vincristin, eventuell noch Methotrexat. Bei der Bestrahlung werden im Mittel 3000 rad Herddosis gegeben, mitunter wird das Gehirn prophylaktisch bestrahlt. (Hornback 114 und Makoski 163)

Das kleinzellige Bronchialkarzinom spricht in 70 - 80 % auf eine Bestrahlung an, jedoch verbessert dies nicht die Überlebenszeit, weil diese Karzinomform zum Zeitpunkt der Entdeckung meist schon weit im Körper verstreut ist. Ähnlich verhält es sich bei den anderen Formen des Bronchialkarzinoms. Die Indikation zur Bestrahlung sind lediglich:

Linderung der Schmerzen, Verhinderung einer Obstruktion und prophylaktische Hirnbestrahlung zusätzlich zur Zytostase. Auf Zyklophosphamid spricht am besten das kleinzellige Bronchialkarzinom an (bis zu 85 %), alle anderen Zytostatika und histologischen Typen kommen höchstens auf 40 %. In Kombination sind ebenfalls am erfolgreichsten beim kleinzelligen Lungenkrebs: Zyklophosphamid, Adriamycin, Methotrexat, Vincristin. (UICC 237)

2.1.7. Die Prognose ist gerade beim Bronchialkarzinom als äußerst schlecht zu bezeichnen. Eine klinisch-pathologische Studie beim Plattenepithelkarzinom der Lunge ergab bei 734 Personen eine Fünf-Jahres-Überlebens-Rate von nur 5 % und eine mittlere Überlebenszeit von lediglich 5,9 Monaten. Dies sind entmutigende Zahlen.

151 von 201 Operationen waren kurativ, während Chemotherapie und Bestrahlung im fortgeschrittenen Stadium auch in Kombination nur eine kurze Remissionsphase von wenigen Monaten bewirkten. Ein Patient von insgesamt 39 lebte allerdings nach Behandlung noch nach 11 Jahren und drei Monaten, dies ist jedoch eine große Ausnahme.

Die mittlere Überlebenszeit nach Resektion im Stadium I betrug 23,2 Monate, bei allen Resektionen insgesamt lag sie bei 14,1 Monaten.

Bei Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie hatten die Patienten im Durchschnitt noch 6,8 Monate zu leben. Wurde nur Bestrahlung allein angewendet, so lag der Wert bei 5,9 und bei Chemotherapie allein bei 5,2 Monaten. Die Überlebenszeiten, nach dem histologischen Typ gegliedert, ergab folgende Ergebnisse:

Adenokarzinom	9,3 Monate
Plattenepithelkarzinom	5,9 Monate
Haferzellkarzinom	4,5 Monate

Zu diesen Untersuchungsergebnissen gelangte die Gruppe um Marabella (165)

2.2. Immunologie, Immundiagnose und Immuntherapie des Lungenkrebses

2.2.1. Der Sonderfall des Alveolarzellenkarzinoms

Coalsen und Mohr (039) gewannen durch Nadelbiopsie Alveolarzell-Karzinomgewebe und untersuchten dieses mit dem Elektronenmikroskop. Sie fanden dabei einen bestimmten Zelltyp mit ungewöhnlichen Zellkerneinschlüssen, welcher nur bei dieser besonderen Karzinomform gefunden wurde.

Nordquist von derselben Arbeitsgruppe (192) wies mittels Immunodiffusion und Immunofluoreszenz Antigene nach, die in den Tumoren selbst , aber auch in Tumorzelllinien auftraten. Virusähnliche Partikel von Alveolarzellkarzinomen wurden dazu benutzt, um ein Antiserum herzustellen.

Dieses Antiserum vom Schaf gegen Alveolarzellkarzinom wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß ähnliche Antigene sowohl beim Alveolarzellkarzinom als auch beim Adenokarzinom der Lunge und überraschenderweise auch beim Morbus Hodgkin vorkommen. (179) Ebenfalls von derselben Arbeitsgruppe wurden mit der direkten Immunfluoreszenz lymphozytenassoziierte Antigene erkannt, die beim fortgeschrittenen Alveolarzellkrebs auftraten. (180)

2.2.2. Immuntherapie

Levamisole, eigentlich ein breitspektrales Anthelminthikum, wurde schon beim Morbus Hodgkin als unspezifischer Immunstimulus erfolgreich angewandt. James (121) gibt an, daß die intrapleurale Gabe beim Bronchialkarzinom besser wirkt als die Applikation durch Skarifikation. Vor allem sollen anergische T-Zellen stimuliert werden.

Gropp und Havemann sahen eine verstärkte Hautreaktion nach Gabe von BCG und Levamisole, außerdem zeigte sich eine verstärkte Antwort der Lymphozyten auf PPD. (090)

Die Schwächung des zellulären Immunsystems bei malignen Erkrankungen ist bekannt, es gibt zahlreiche Versuche, durch unspezifische Anregung das Immunsystem zu einer verbesserten Immunabwehr zu bringen.

Oldham und Mitarbeiter (196) untersuchten über hundert Lungenkrebspatienten immunologisch. Die Hälfte davon wurde mit BCG behandelt, wobei sich aber hier keine verlängerte Überlebenszeit ergab.

McKusally und andere (171) sahen Erfolge mit intrapleuraler Gabe von BCG bei Frühstadien des Lungenkrebses, wobei der Harnzellkrebs allerdings ausgeschlossen war.

Yasumoto und Mitarbeiter (265) wiederum behaupten, daß die Überlebenszeit auch in Spätstadien durch BCG-Verabreichung verlängert werden kann. Die proliferative Antwort und die Zytotoxizität bei Lymphozyten wurde durch diese Behandlung wiederhergestellt.

Jansen und Mitarbeiter (122) wiesen nach, daß die BCG-Behandlung nach Resektion mit Minimalresiduen die Prognose beim Lungenkrebs signifikant verbessert.

Kerman und Stefani (132) beobachteten, daß Patienten länger überlebten, wenn zur Bestrahlungstherapie zusätzlich auch noch BCG gegeben wurde. Die Immunantwort wurde dadurch verstärkt.

2.2.3. Zelluläres Immunsystem

Viele Patienten mit Lungenkrebs haben eine schwache Immunantwort vom verzögerten Typ. Dies wurde von Holmes und Morton (113 und 183) als Reaktion der Haut auf 2-4-Dinitrochlorbenzol (DNCB) gemessen. 97 % der Normalbevölkerung können mit DNCB sensibilisiert werden, eine deutliche Immunantwort auf eine zweite Gabe von DNCB bedeutet ein intaktes Immunsystem. Die Antwort auf DNCB korrelierte recht gut mit dem Krankheitszustand.

Concannon und Mitarbeiter (040) stellten fest, daß die Antwort auf DNCB im Vergleich zu anderen Antigenen, welche ebenfalls geprüft wurden, am besten mit der Überlebenszeit übereinstimmte.

Wanebo und Mitarbeiter (251) hingegen meinen, daß die beste Korrelation zwischen Krankheitsstadium und der PHA-(Phytohämagglutinin) Reaktion mit den Lymphozyten besteht. Die PHA-Reaktion auf Lymphozyten war im klinischen Stadium I noch normal und im Stadium III signifikant vermindert.

Boddie et al. (021) untersuchten die Leukozytenmigration im Agaroseassay bei 22 Patienten mit Lungenkrebs: 17 Patienten zeigten eine signifikant stärker gehemmte Wanderung bei mindestens einem verwandtem Tumorextrakt.

Die Zytotoxizität von Lymphozyten gegen allogenetische Target-Zellen wurde von Manabe et al. (162) geprüft. Hierbei ergab sich eine größere Zytotoxizität in den Stadien I - III gegenüber den Kontrollen, als dies im Stadium IV der Fall war. Die Resektion des Tumors erhöhte die Zytotoxizität in den Stadien II und III. Die BCG-Gabe erhöhte die Zytotoxizität in allen vier Stadien.

Beim Morbus Hodgkin ist bekannt, daß die Anwesenheit von HL-A 8 (humanes Leukozyten-Antigen) eine längere Überlebenszeit bedeutet. Dillion und andere (045) stellten nun fest, daß beim Adeno- und Plattenepithelkarzinom der Lunge 86 % der geheilten Fälle HL-A 10 oder W-5 besaßen, beziehungsweise die kreuzreagierenden W-19 oder HL-A 5. Der Anteil der W-19 und HL-A 5 Träger war aber bei der geheilten Gruppe höher als in einer Kontrollgruppe, so daß der Schluß naheliegt, daß die Anwesenheit von W-19 oder HL-A 5 die Prognose beim Lungenkrebs verbessert, ohne aber sein Auftreten zu verhindern.

Douwes et al. (051) entwickelten eine in-vitro-Methode, bei der Leukozyten, die mit dem enzephalitogenen Faktor inkubiert wurden, wiederum einen Faktor freisetzen, der die Wanderungsgeschwindigkeit von Schäferythrozyten vermindert. Dieser Faktor

soll die Unterscheidung zwischen benignen und malignen Erkrankungen ermöglichen. Falsch-negative Ergebnisse treten auf bei gleichzeitiger Bestrahlung und Chemotherapie des Bronchialkarzinoms. Die entzündlichen und degenerativen Erkrankungen führen zu einer Beschleunigung der Wanderung, während die Malignome durch eine Verminderung der Geschwindigkeit gekennzeichnet sind. Den Malignomen am nächsten kommt noch der Morbus Boeck, bei dem gelegentlich eine Hemmung auftritt, die aber nie 4 % überschreitet. Aus diesem Grunde wird die Unterscheidungsgrenze bei 5 % angesetzt. Eine totale Resektion des Tumors verändert die Ergebnisse im EMT (Erythrozyten-Migrations-Test) kaum, aber die Antwort ist schon bei sehr kleinen Tumoren gegeben. Der EMT kann keine artspezifische Diagnose liefern, das Verfahren ist zudem für eine breite Anwendung zu aufwendig und auch nicht unumstritten, was wissenschaftlichen Ansatz und die Ergebnisse betrifft.

2.2.4. Humorales Immunsystem (einschließlich Grenzgebiete)

2.2.4.1. Laktoferrin

Über Laktoferrin ist noch sehr wenig bekannt. Fedail und Harvey (1961) bestimmten das Laktoferrin mit einem Radio-Immuno-Assay. Sie erhielten hohe Werte bei der chronischen Pankreatitis, niedrige Werte ergaben sich beim Pankreaskarzinom. Die Kontrollpersonen hatten Werte um 130 ng/ml (Bereich zwischen 30 und 390). Bei Pankreaskarzinom lag der Mittelwert bei 105 ng/ml (Bereich 10 - 390), die chronische Pankreatitis erbrachte Werte um 2300 ng/ml (Bereich zwischen 870 und 11 400).

Laktoferrin zeigt eine gewisse Verwandtschaft mit Transferrin:

Beide binden zwei Eisenatome pro Molekül und beide haben ein ähnliches Molekulargewicht, nämlich im Bereich von 70 - 80 000.

Figarella und Mitarbeiter unternahmen Messungen im Pankreassaft mittels radialer Immunodiffusion und Radio-Immuno-Assay. Die Werte waren im Bezug auf die Erkrankung so ähnlich verteilt wie bei Fedail. (062)

Mason und Taylor untersuchten verschiedene menschliche Gewebe hinsichtlich des Gehaltes an Transferrin, Ferritin und Laktoferrin. Sie verwendeten die Immunoperoxidase-Technik. (167).

Transferrin kommt demnach vor allem in Leberzellen, Histiozyten, Tubuluszellen und epithelialen sowie myoepithelialen Zellen vor. Ferritin tauchte vorwiegend in Leberzellen und Histiozyten auf. Laktoferrin wurde gehäut in der laktierenden Brustdrüse, in den Bronchialdrüsen und in epithelialen Zellen des Magens und Zwölffingerdarms gefunden.

Veltri und Mengoli (238) stiessen auf der Suche nach tumor-assoziierten Antigenen des Bronchialkarzinoms auch auf das Laktoferrin. Es wurden aber keine radioimmunologischen Messungen durchgeführt.

2.2.4.2. Ferritin

Etwa 25 - 30 % des gesamten Körpereisens sind im Ferritin und im Hämosiderin enthalten. Ferritin ist ein wichtiges Depot-eisen. Schon im Jahre 1894 wurde es von Schmiedeberg entdeckt. Laufberger war es dann, der Ferritin aus der Pferdemilz isolieren konnte. Das Apoferritin besteht aus 24 Untereinheiten, die identisch zu sein scheinen. (Wetz und Crichton 256).

Nach Fagard und Saddi (060) kommt Ferritin bei Pflanzen, Pilzen, Wirbellosen und Säugetieren vor, bei letzteren vor allem in Leber, Milz und Knochenmark, aber auch in Nieren, Darm-

schleimhaut und Haut. Das gesättigte Eisenprotein hat ein Molekulargewicht von 900 000, es kann bis zu 5 000 Eisenatome aufnehmen.

Nach Munro und Linder (185) wird die Sedimentationskonstante mit 17 S für das Apoferritin und mit 24 S für das Holo-ferritin angegeben. Die 24 Untereinheiten haben jeweils ein Molekulargewicht von 18 500, die elektrophoretisch mehr sauren Herz- und HeLa-Isoferritine enthalten auch schwerere Untereinheiten mit 21 000 Dalton.

Die Quelle für das Serumferritin scheint das RES mit den Kupfferschen Sternzellen zu sein. Die Normalwerte für das Serumferritin liegen zwischen 60 und 140 ng/ml.

Bei der Eisenmangelanämie liegen diese Werte konstant unter 12 ng/ml, während der Ferritinspiegel bei Eisenüberladung auf 1000 ng/ml ansteigen kann.

In der Schwangerschaft fällt das Ferritin bei der Mutter auf Werte ab, wie sie bei der Eisenmangelanämie typisch sind. Das Serumferritin des Neugeborenen ist erhöht und fällt innerhalb der ersten drei Monate, während das fetale Hämoglobin gegen das Erwachsenen-Hämoglobin ausgetauscht wird, auf einen Serumspegel von ungefähr 30 ng/ml ab.

Dieser bleibt bis zur Pubertät so bestehen. Ab dann steigt der Spiegel bei den männlichen Personen bis auf 100 ng/ml, verbleibt bei den weiblichen aber bei etwa 35 ng/ml. Bei den Frauen in der Postmenopause gleicht sich der Wert dem bei den Männern an.

Die Gewebskonzentration des Ferritin liegt zwischen 40 und 600 mikrogramm/g. Intrazellulär ist Ferritin diffus im Zytoplasma verteilt. (Zähringer 268).

Buffe et al. (1931) fanden im Serum von Krebskranken, sowie im fetalen Blut und im Fruchtwasser erhöhte Konzentrationen eines Glykoferroproteins, das sie Alpha-2-H-Ferroprotein

nannten. Später stellte sich heraus, daß dieses eisenbindende Protein mit Ferritin immunologisch identisch ist.

Für die Messung von Serumferritin sind inzwischen viele Methoden entwickelt worden. Addison (001) 1972, Miles (175) 1974 und Halliday (101) 1976 bestimmten mit radioimmunometrischen Meßmethoden das Ferritin im Serum. (001, 101, 175) Hierbei liegen die Mittelwerte bei verschiedenen Untersuchungen für Männer zwischen 50 und 200 ng/ml sowie bei Frauen zwischen 30 und 160 ng/ml. Bei intravenöser Eisengabe steigt das Serumferritin schnell auf Werte über 1000 bis zu 3000 ng/ml an. (Hausmann 105) Die Hauptbedeutung des Ferritins liegt zweifellos in der Regulation des Eisenstoffwechsels. Halliday et al. (102) untersuchten 43 Familien mit insgesamt 242 Mitgliedern, in denen die idiopathische Hämochromatose gehäuft vorkam. Die Serumeisenkonzentration lag nur bei 76 % der Verwandten mit erhöhtem Eisenspeicher über dem Normalwert, wohingegen das Serumferritin in 98 % der Fälle erhöht war. Hier lagen nur drei Fälle mit normaler Eisenspeicherung über dem Normbereich. Somit ist die Serumferritinbestimmung ein brauchbarer Suchtest für die präzirrhotische Hämochromatose.

Oertel und Gerhartz (194) fanden bei 66 von 73 Patienten mit einer Eisenmangelanämie Serumferritinwerte unter 40 ng/ml. Des weitern fanden sie eine strenge Korrelation zwischen Nicht-Hämoglobin-Eisen und dem Ferritin im Knochenmark. Auch die Serumferritinkonzentrationen stimmen gut mit den Ferritinwerten im Knochenmark überein. (195)

Akahonai et al. (003) geben an, daß die Isoferritine, welche beim primären Leberzellkarzinom und bei der akuten myeloiden Leukämie auftragen, dem normalen Leberferritin sehr ähnlich sind. Zusätzlich ergab sich aber eine kleine Menge von mehr sauren Isoferritinen mit einem isoelektrischen Punkt von 4,90 bis 5,10, die in der normalen Erwachsenenleber nicht

vorhanden sind. Die sauren Bestandteile sind auch in der fetalen Leber anwesend, aber nicht bei AML-Patienten, wo mehr die basischen Isoferritine überwiegen. Der isoelektrische Punkt liegt in diesen Fällen zwischen 5,25 und 5,65. Die Auftrennung der Isoferritine erfolgte mittels Dünnschicht-Gel-Elektrofokussierung.

Hazard et al. (107) fanden Isoferritine des Herzens in einem pI-Bereich zwischen 4,8 und 5,4 als mehr im sauren Bereich. HeLa-Ferritin (HeLa-Zellen sind menschliche Tumorzellen aus der Kultur eines Zervixkarzinoms) hat eine schmale pI-Breite von nur 4,8 bis 5,0. Die mehr basischen Ferritine bestehen überwiegend aus HL-Untereinheiten, während die mehr sauren vor allem aus der H-Untereinheit zusammengesetzt sind. Im Ouchterlony-Test sind alle menschlichen Ferritine immunologisch identisch, nur die Stärke der Präzipitation ist etwas unterschiedlich. Es ist also wichtig, die Ferritine in saure und basische Isoferritine zu unterteilen, um bei genauen und empfindlichen Messungen nicht nur ein Gemisch aus den verschiedenen Untereinheiten des Ferritins darzustellen.

Arosio et al. (106) stellten fest, dass die immunologischen Unterschiede von Serum-Isoferritinen besser mit Antiseren darzustellen waren, die in Meerschweinchen gegen die mehr sauren Isoferritine von Herz und HeLa-Zellen hergestellt wurden. Alle Ferritine ergaben zwei Präzipitationslinien mit Ausnahme des mehr basischen Leberferritins.

Beide Linien repräsentieren Ferritin und korrespondierende Linien sind immunologisch identisch. Der isoelektrische Punkt nahm in folgender Reihenfolge zu: HeLa-Zellen, Herz, maligne Tumoren, Leber und basische Leber-Ferritine. Zwei Präzipitatslinien repräsentieren zwei Antikörperpopulationen mit zwei Untereinheiten, die sich immunologisch unterscheiden. HL (steht für human liver) -Untereinheiten finden sich auf der einen Seite und H (für heart)-Einheiten auf der anderen.

Antikörper ergeben gegen HeLa-Zellen gerichtet identische Reaktionen im Bezug auf Herz- und HeLa-Ferritin. Krebszellen der HeLa-Zellkultur enthalten also mehr Ferritin mit der H-Untereinheit (mehr saures Isoferritin).

Hazard et al. (106) bestimmten in einer anderen Untersuchung das Verhältnis dieser Untereinheiten in verschiedenen Geweben. Danach enthält Leber 90% HL- und nur 10% H-Einheiten, eine Lebermetastase enthielt 85% HL- und 15% H-Einheiten, beim Herz ist das Verhältnis 60 zu 40 und bei den HeLa-Zellen 30 zu 70.

Niitsu et al. (188) fanden beim Hepatom und beim Pankreaskarzinom mehr basische Isoferritine vor, während bei der chronisch -myeloischen Leukämie mehr die sauren Isoferritine vorherrschten.

Kew et al. (134) bestimmten das Ferritin beim Hepatom, es war bei 58 von 76 Farbigen mit dieser Erkrankung erhöht; ferner lag eine negative Korrelation zwischen Ferritin und AFP vor. Das geometrische Mittel der Werte lag hier bei 845 ng/ml (Bereich zwischen 30 und 25 600 ng/ml, die Bestimmungen wurden vorgenommen gemäß dem Radio-Immuno-Assay von Miles)

Giler et al. (181) fanden hohe Ferritinkonzentrationen vor allem in Leber, Milz und Knochenmark. Die Isoferritine mit einem sauren isoelektrischen Punkt wurden vorwiegend beim Brustdrüsen-, Magen- und Pankreaskrebs und

und auch in der menschlichen Fetalleber nachgewiesen.

Parry und Mitarbeiter (202) bestimmten die Serumferritinwerte bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie, diese lagen über zehnmal höher als bei normalen Kindern.

Untersuchungen über Ferritinspiegel beim Lungenkrebs liegen bisher nur sehr wenige vor. Veltri und Mengeli (238) beschrieben drei "tumorassoziierte" Antigene beim Bronchialkarzinom. Das erste stellte sich als normales Serumprotein aus der Cohn-IV-Fraktion heraus. Das zweite Antigen zeigte Kreuzreaktion mit Anti-Human-Leber-Ferritin und das dritte schließlich zeigte Kreuzreaktion mit Anti-Human-Laktoterrin. Alle drei waren bei Extraktion von Tumorgewebe (Plattenepithelkarzinom der Lunge) in 50 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung enthalten.

Gropp und Mitarbeiter (091) haben AFP, CEA, Ferritin und Alpha-2-PAG beim Bronchialkarzinom gemessen. Die AFP-Spiegel lagen praktisch immer im Normalbereich, während die restlichen drei Tumormarker in über 50 % der Fälle erhöht waren. CEA und Ferritin wurden in Extrakten von Bronchialkarzinomen durch spezifische Antiseren nachgewiesen. AFP und CEA wurden im RIA gemessen, während Ferritin und Alpha-2-PAG mit der Laurell-Elektrophorese bestimmt wurden. Bei CEA und Ferritin ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen lokaler Tumorausbreitung und Metastasierung, nicht aber in Hinsicht auf den histologischen Typ.

2.2.4.3. Alphafetoprotein (AFP)

AFP ist ein Alpha-1-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von annähernd 65 000, das im Fetalleben im Gastrointestinaltrakt, in der Leber und im Dottersack gebildet wird. Es tritt beim Menschen wie bei den Säugetieren schon in einem sehr frühen Stadium der Schwangerschaft im Serum auf. Etwa zehn Monate nach der Geburt fällt der Spiegel auf minimale Werte ab (unter

15 ng/ml) und bleibt unter normalen Umständen das ganze Leben lang so niedrig. Die äußerst geringen Konzentrationen beim gesunden Erwachsenen sind nur mit Hilfe eines sehr empfindlichen Radio-Immuno-Assays nachzuweisen. Die mögliche Bedeutung des AFP für den Feten liegt im Schutz vor dem mütterlichen Östrogen (Östrophile Eigenschaft).

Tritt im Erwachsenenalter ein primäres Leberzellkarzinom auf, so ist AFP im Serum regelmäßig erhöht (bis zu 90 %) und nimmt im Verlauf noch zu. (Maximale Spiegel können Werte bis über 100 mg% erreichen) Bei teratogenetischen Geschwülsten (50 - 70 % der nicht seminomatösen Keimzelltumoren) ist AFP auch in vielen Fällen in gesteigerter Konzentration nachzuweisen, aber nicht in dem Ausmaß wie beim Hepatom. Hier dient AFP vornehmlich zur Therapie- und Verlaufskontrolle. Seltener AFP-Vermehrungen finden sich noch bei Lebermetastasen von anderen Organtumoren (zum Beispiel Bronchial-, Magen- und Gallenblasenkarzinom).

Auch entzündliche Erkrankungen des Digestionstraktes, hier vor allem die Hepatitis, Leberzirrhose zeigen in seltenen Fällen transitorische Vermehrungen der AFP-Konzentration (meistens kleiner 500 ng/ml).

Überdies haben Untersuchungen ergeben, daß AFP eine sehr wichtige Rolle in der Schwangerschaftsüberwachung und -diagnostik spielt. Mit Hilfe von AFP kann man das Gestationsalter bestimmen, dies ist ein wichtiger Vergleich zur sonographischen Festsetzung des Schwangerschaftstadiums. Bei Neuralrohrdefekten ist AFP regelmäßig sehr stark im Fruchtwasser erhöht. Bei jeder Amniozentese sollte AFP routinemässig mitbestimmt werden. Auch beim sogenannten "fetal-distress-syndrome" und bei der Blasenmole beziehungsweise dem Chorionkarzinom der Frau spielt die Messung von AFP eine große Rolle.

Das verbreitetste Verfahren für den Nachweis von AFP ist die Immunodiffusion, diese ist aber der unempfindlichste Test, ihr

Bereich liegt zwischen 1 und 5 Mikrogramm/ml. Dagegen erlaubt die hohe Empfindlichkeit des RIA auch die Bestimmung der niedrigen Serumkonzentrationen beim gesunden Erwachsenen. Die Empfindlichkeit des Radio-Immuno-Assays liegt bei kleiner 1 ng/ml.

Der normale AFP-Spiegel beim Erwachsenen geht nicht über 15 ng/ml hinaus. Die Serumkonzentration bei gesunden Schwangeren bewegt sich im dritten Trimenon bis zu 550 ng/ml. Bei der Hepatitis, Leberzirrhose und anderen gutartigen Leberaffektionen steigen die AFP-Werte kaum über 1 Mikrogramm/ml. Die weitestgehenden AFP-Erhöhungen finden sich beim primären Leberzellkarzinom, hier treten Serumspiegel im Bereich bis über 100 mg pro 100 ml auf. Lamerz (149)

In den letzten Jahren wurde AFP auch beim Bronchialkarzinom untersucht. Es ergab sich Übereinstimmend, daß das Auftreten eines Lungenkarzinoms nicht so häufig mit erhöhten AFP-Spiegeln korreliert. Burt und Ratcliffe (032) stellten stellvertretend für viele andere Untersucher fest, daß Alpha-Fetoprotein nur in 1,5 % der Fälle von Lungenkarzinom über die 95. Perzentile hinaus erhöht war.

2.2.4.4. Das karzinoembryonale Antigen (CEA)

Gold und Freedman entdeckten 1965 CEA in Adenokarzinomen des Kolons. (082) In der Folgezeit wurde CEA in verschiedenen Körperflüssigkeiten und -geweben gefunden.

CEA ist ein Glykoprotein mit einer elektrophoretischen Beta-Mobilität; das Molekulargewicht liegt zwischen 150 000 und 200 000. Der Kohlenhydratgehalt wird zwischen 50 und 70 % angegeben. Der isoelektrische Punkt liegt bei 4,8. Die Angaben über die Sedimentationskonstante schwankt zwischen 2 und 10,2 bei einer dichteren Streuung im Bereich von 6,8 bis 8,5.

CEA ist ein Oberflächen-Antigen, das im fetalen Pankreas und im Gastrointestinaltrakt gebildet wird. Beim gesunden Erwachsenen findet sich CEA auch in sehr geringer Konzentration im Darm, im Pankreas, in der Leber, Lunge und Brustdrüse. Mit Hilfe des RIA ist CEA bei niedrigen Spiegeln auch im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten meßbar. Die obere Normgrenze beim Serum/Plasmaspiegel wird je nach Bestimmungsmethode bei 3 bis 10 ng/ml angesetzt.

Pathologisch hohe CEA-Spiegel werden bei malignen Tumoren des Verdauungstraktes und hier vor allem beim Dickdarmkarzinom und dann beim Pankreaskarzinom gemessen. Auch beim Bronchialkarzinom und beim metastasierenden Mammakarzinom werden Positivitätsraten von 50 beziehungsweise 70 % angegeben. Niedrigere Positivitätsraten ergeben sich bei einer Vielzahl von anderen malignen Organtumoren. Die Höhe des CEA-Spiegels und die Häufigkeit des Auftretens korreliert stark mit dem Stadium und der Ausbreitung des Tumorgeschehens.

Nichtmaligne Erkrankungen von Leber, Pankreas und Darm ergeben selten niedrig-konstante oder transitorische CEA-Spiegel-Erhöhungen im Serum. Die Positivitätsraten schwanken hierbei zwischen 16 und 60 %. Die Wahrscheinlichkeit einer malignen Erkrankung wächst in dem Masse, wie hoch der CEA-Wert liegt (zum Beispiel über 50 ng/ml) und ob er im Verlauf weiter ansteigt.

Nach bisherigen Erfahrungen mit der CEA-Bestimmung eignet sich dieses Verfahren nicht als Screening-Test zur Frühdiagnose einer malignen Erkrankung, aber bei selektierten Patientengruppen in Verbindung mit anderen erprobten Verfahren wie dem Hämokult-Test, dem Röntgen, sowie der Endoskopie zur frühzeitigen Erkennung eines malignen Prozesses im Bereich von Dickdarm, Pankreas und Leber. Ferner eignet sich der CEA-Test bei bekanntem Malignom im Bereich des Verdauungstraktes und auch bei Bronchial- und Mammakarzinomen zur Therapie- und

Verlaufskontrolle, wenn der CEA-Spiegel schon vor Behandlung hoch war. Ein CEA-Abfall in den Normalbereich vier bis acht Wochen nach der Tumoresektion korreliert gut mit einer vollständigen Entfernung und Rezidivfreiheit. Ein konstanter hoher oder sogar ansteigender CEA-Wert legt den Schluß auf einen Residualtumor oder eine Metastasierung nahe. Oft kommt auch nach langwährender Rezidivfreiheit ein erneutes Aufflackern der Tumorkrankheit zu Stande, dann steigt der CEA-Wert wieder auf erhöhte Spiegel an. Jamerz (149)

Sizaret und Martin (227) konnten bei 19 Extrakten von Lungenkarzinomen in 6 Fällen mit Hilfe der direkten Immunodiffusion CEA nachweisen. Wurde nun das scheinbar negative Lungenkrebsgewebe speziell mit Perchlorsäure extrahiert, so erhöhte sich die Positivitätsrate auf vier von fünf CEA-positiven Bronchialkarzinomen. Hinsichtlich des histologischen Typs ergab sich kein auffälliger Unterschied.

Vincent und Chu (241) bestimmten CEA im Serum von 115 Patienten mit Lungenkarzinom während verschiedener Zeiten und Stadien. Die Positivitätsrate im CEA-Assay betrug bei allen Lungenkarzinomen 77 %. Bei den noch operablen Frühfällen waren es noch 70 %. Bei Patienten mit CEA-Werten über 15 ng/ml war die Prognose im allgemeinen sehr schlecht. Es ergab sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen histologischen Typen des Bronchialkarzinoms. Bei Verlaufskontrollen gab sich häufig ein typischer CEA-Anstieg unmittelbar nach Operationen, sodann ein Abfall des Spiegels in den normalen Bereich innerhalb von 30 Tagen. Der CEA-Spiegel blieb im Normbereich, solange sich kein Rezidiv und keine Tumprogression entwickelten. Zytostatika konnten den CEA-Spiegel vorübergehend drei bis vier Monate senken. Bei der Bestrahlung war es ähnlich.

In einer späteren Arbeit teilten Vincent und Chu (242) die Patienten mit Bronchialkarzinom in drei Gruppen ein:

Gruppe I enthielt Personen mit mehr als fünfzehn Monate Rezidivfreiheit nach Tumorresektion. In diesem Kollektiv war der Serum-CEA-Wert bei 0,4 ng/ml im Mittel.

Die Gruppe II war definiert nach mehr als fünfzehn Monaten nach Tumorresektion, aber mit Rezidiv. Hier war der mittlere CEA-Wert bei 3,7 ng/ml. Typisch bei dieser Gruppe war ein anfänglicher Abfall einige Zeit nach der Operation, aber ein erneuter Anstieg beim Auftreten der Tumorprogression.

In Gruppe III befanden sich Patienten, die innerhalb von fünfzehn Monaten an ihrem Tumorleiden verstorben waren, nachdem eine Operation kein kuratives Ergebnis mehr bewirkte. Hier betrug der Mittelwert 5,6 ng/ml. Typisch war wiederum in diesen Fällen ein Abfall des CEA-Spiegels einige Zeit nach der Operation und ein Wiederanstieg nach etwa drei Monaten, ähnlich wie bei der Gruppe II.

Luporini und Frascini (160) stellten einen engen Zusammenhang zwischen Remission des Tumorleidens und einem Abfall des CEA-Spiegels fest, ebenso war eine Tumorprogression mit einem erneuten Anstieg des CEA korreliert.

Ford et al. (064) bestimmten den präoperativen CEA-Spiegel bei 256 Patienten mit Bronchialkarzinom. 99 % der Werte lagen über 5 ng/ml; Davon wiederum lagen 41 % über 15 ng/ml, nur 6 % lagen höher als 50 ng/ml. Von dieser Gruppe waren die Hälfte Adenokarzinome der Lunge. Die CEA-Werte in der Verlaufskontrolle zeigten bei dieser Arbeitsgruppe keine eindeutigen Unterschiede.

Gropp und Mitarbeiter (091) extrahierten Tumorgewebe von Lungenkarzinompatienten mit 3,0 mKCL und mit 50 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung, sie konnten CEA nachweisen. Gegen CEA wurde ein spezifisches Antiserum hergestellt. Mit Hilfe eines Radio-Immuno-Assays wurde CEA im Serum von Lungenkrebskranken gemessen; dabei stellte sich heraus, daß in 50 % der Fälle CEA im Serum erhöht war.

Pascal et al. (203) untersuchten histologisch mit der Immunoperoxidase-Methode Gewebe in 58 Fällen von Bronchialkarzinom auf CEA. In der Mehrheit der Adenokarzinome konnte CEA nachgewiesen werden, nicht aber bei den meisten Plattenepithelkarzinomen der Lunge.

Burt und Ratcliffe (032) bestimmten bei Bronchialkarzinompatienten fünf mögliche Tumormarker im Serum, nämlich CEA, PAM=SP 3, HCG, Kasein und AFP. Sie fanden folgende Positivitätsraten: CEA 17 %, PAM 16 %, Kasein 14 %, HCG 6 % und AFP mit nur 1,5 %. Speziell bei CEA ergab sich eine Rate von 23 %, wenn sich der Tumor über den Brustraum hinaus ausgedehnt hatte. Hierbei handelte es sich im wesentlichen um anaplastische und Adenokarzinome. Als positiv wurden die Fälle angesehen, die im Vergleich zur Kontrollgruppe (Patienten mit benignen Lungenerkrankungen wie Tuberkulose oder chronischer Bronchitis) oberhalb der 95. Perzentile lagen.

2.2.4.5. Andere tumorassoziierte und karzinofetale Antigene

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten schon beschriebenen sowie einige seltenere beziehungsweise vermeintliche tumorassoziierte und karzinofetale Antigene mit den gefundenen Tumorerkrankungen vergleichend zusammengestellt (Lamerz 149).

Bezeichnung	Autoren	Vorkommen
Alphafetoprotein	Bergstrand/Czar Abelev/Tatarinov	Primäres Leberkarzinom
		Teratokarzinom
		Neuralrohrdefekt
Karzinoembryonales Antigen	Gold/Freedman	Digestions-Trakt
		Lungen/Mammakarzinom

Alpha-2-H-Fetoprotein (immunologisch identisch mit Ferritin)	Burke	HNO/Digestionstrakt/ Lunge/Mamma
Fetales Sulphoglykoprotein	Häkkinen	Magensaft beim Magenkarzinom
Gamma-Fetoprotein	Edynak	HNO/Magen/Darm/Urogenital/Lungenkrebs
Leukämieassoziierte Antigene	Harris/ Viza et al.	Leukämie/Morbus Hodgkin
Karzinoplazentale alk. Phosphatase (Regan Isoenzym)	Fishmann	<u>Lunge</u> /Brustdrüse/Magen/Darm/Urogenital-Ka./Lymphom/Myelom
Ektopisch gebildete Hormone wie ACTH, HCG, Beta-HCG, HPL	Viele Autoren	Digestionstrakt/ Brustdrüse/Lungenka./ Malignes Melanom, Teratom
Fetale tumorständige Makromoleküle	Klavins, Yachi, Tee	Lunge/Brustdrüse/ Dickdarm/Leber/Nieren/ Hautka.
Karzinofetales Glia-Antigen (CFGA)	Trouillas	Glioblastom/Astrozytom
Embryonales Antigen	Tatarinov	Ovarial- und Kolon- Adeno-Ka.

Beta-Onkofetales Antigen (Bofa)	Fritsche/ Mach	Dickdarm/Lunge/Leber/ Nieren/Pankreas/Brust- drüsen-Ka.
Onkofetales Pan- kreas-Antigen	Banwo	Pankreaskarzinom
Fetorenales Anti- gen (FRA)	Kistler/ Sonnabend	Nierentumoren
S-2-Antigen	Mukherji/ Hishaut	Sarkome/Leukämie

2.2.4.6. Nichtidentifizierte Antigene beim Bronchialkarzinom

Yachi und Matsuura (263) stellten Ziegen- und Kaninchenserum gegen saline, in 50 % Ammoniumsulfat lösliche Extrakte von Lungenkarzinomen, primären Leberzellkarzinomen und malignen Dickdarmtumoren her. Nach Absorption mit normalen Erwachsenengewebe reagierten die Antiseren noch mit Bronchialkarzinom, mit anderen Karzinomen und auch noch mit fetalem Gewebe. In der Immunodiffusion liessen sich zwei Gewebekomponenten nachweisen, die zumindest quantitativ kennzeichnend für Lungenkrebs waren. Zwölf Patienten wurden auf dieses Antigen hin untersucht, Yachi nennt die zwei Komponenten X und Y, bei fünf Patienten ließ sich X und Y darstellen, sechs hatten nur die Y-Antigen-Komponente und ein Patient hatte keines von beiden.

Beide Antigene konnten nicht nur beim Lungenkrebs, sondern auch in Seren von Patienten mit Magen-, Pankreas-, Leber- und Nierenkarzinomen nachgewiesen werden. Zwischen dem Y-Antigen und einem fetalen Protein bestand partielle immunologische

Identität. Durch Gelfiltration konnte das Molekulargewicht bei- der Antigene als größer als das von Ig-G bestimmt werden. X er- wies sich als schwerer im Vergleich zu Y. X und Y konnten nicht in der löslichen Perchlorsäurefraktion des salinen Extraktes ent- deckt werden.

Viza und Louvier (244) entdeckten ein tumorassoziiertes Antigen, sie nannten es B 1, das in einigen Bronchialkarzinomextrakten und auch in Patientenseren anwesend war. Untersucht wurden Plat- tenepithel- und anaplastische Karzinome mit der Überwanderungs- elektrophorese. Dieses Antigen war nun nicht identisch mit ande- ren Antigenen, die von der gleichen Gruppe beim malignen Melanom und bei der Leukämie beschrieben worden waren.

Bell und Seetharam (009) entwickelten in Affen ein Antiserum ge- gen ein hochgereinigtes Plasmamembran-Antigen aus Gewebe von menschlichen Haferzellkarzinomen und führten Vergleichsunter- suchungen mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode durch. Es reagierten 7 von 7 Haferzellkarzinomfällen, keine Reaktion er- gab sich mit 7 Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge, ebenfalls keine Reaktion zeigte sich mit sieben Kolon-, acht Brustdrüsen-, vier hypernephroiden Karzinomen und einem Pan- kreaskarzinom. Das nicht absorbierte Affen-Antiserum reagierte nicht mit normalen Erwachsenengewebe.

Später differenzierten dieselben Autoren (010) zwei Bronchial- karzinom-Antigene. Ein Antigen war charakteristisch für bestimm- te normale epitheliale Zellen des Verdauungssystems, die vom Endoderm abstammen. Das andere Antigen war kennzeichnend für be- stimmte normale Zellen des peripheren Nervensystems, die von der Neuralrinne abstammen. Die Beschreiber nehmen an, daß diese Anti- gene Ausdruck sind für eine genetische Fehlsteuerung, die in den normalen Zellen des Tumorausprungs, in diesem Fall die Lunge mit einer Entartung in ein Haferzellkarzinom, nicht zum Tragen kommt.

Smith und Gehle (228) untersuchten mit einem Festphasen-RIA

Antigen-Antikörper-Reaktionen zwischen verschiedenen menschlichen Zelllinien und Seren von Lungenkrebspatienten. Vier Fetallungenzelllinien und vier Tumorzelllinien dienten als Antigen-Spender. Die Autoren meinten, daß dies ein möglicher Weg zur Immundiagnose des Bronchialkarzinoms sein könnte. Der Nachweis und die Messung von Serum-Antikörpern würden einen großen Fortschritt in der Erkennung von Frühkarzinomen bedeuten. Die beiden Autoren stellten außerdem fest, daß die humanen Fetalzell-Linien nicht mit dem karzinoembryonalen Antigen kreuzreagieren.

Schlipköter und Mitarbeiter berichten in zwei Arbeiten (232 und 233) über zwei Antigene, AS-Tu und AP-Tu. Ersteres Antigen ist sowohl löslich in Perchlorsäure als auch in 50% gesättigter Ammoniumsulfatlösung, das Molekulargewicht dieses Antigens liegt zwischen dem von Ig-G und Ig-A. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurden histologische Schnitte von Lungenkarzinomgewebe untersucht im Vergleich zu Normalgewebe; die Fluoreszenz im Tumorgewebe war dabei signifikant höher. Das zweite Antigen AP-Tu war weder in Perchlorsäure noch in Ammoniumsulfat löslich, dieses Antigen zeigte Alpha-2-Mobilität. Es liegen Hinweise dafür vor, daß AS-Tu mit CEA identisch ist, dies muß aber noch geklärt werden. Die Fluoreszenz in den histologischen Schnitten war im wesentlichen auf die Zellmembran und auf das Zytoplasma beschränkt.

Kelly und Levy (126) entdeckten antigenetische Komponenten aus Plattenepithelkarzinomen der Lunge. Die Untersucher stellten ein Kaninchen-Antiserum dagegen her und absorbierten es mit Glutaraldehyd-Normallungen-Extrakt. Mit normaler Lunge, Leber und Milz war das Antiserum nicht reaktiv, eine schwach positive Reaktion erfolgte mit Fetallungengewebe.

Saline Extrakte von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge, löslich in 50% Ammoniumsulfat, wurden von Frost und Rogers untersucht. (072) Sie fanden ein Antigen, welches bei 30 min. und 50° C hitzestabil war; es wanderte bei pH 8,5 zur

Kathode war stabil bei pH 4,5 und hatte ein Molekulargewicht von $4,0 \times 10^4$. Eine Identität mit CEA bestand nicht. In Perchlorsäure-Extrakten ließ sich dieses Antigen mehrmals nicht nachweisen.

Zwei verschiedene Antigen-Komponenten beim Bronchialkarzinom entdeckten auch die Autoren Watson und Smith (254). Eine Komponente hat Bezug zur fetalen Lunge, ist aber weder mit CEA noch mit AFP identisch. Ein hohes Maß an Kreuzreaktionen zeigte sich zwischen Plattenepithel- und anaplastischen Karzinomen. Ford und Hettiarachchi (265) stellten nach ihren Angaben ein selektives Anti-Lungenkarzinom-Serum her. Sie nahmen an, daß es spezielle Oberflächen-Antigene an den Zellen von Bronchialkarzinomen gibt.

Newman und Mitarbeiter (187) stellten ein Ziegen-Antiserum gegen Haferzellkrebs der Lunge her. Mit Hilfe einer direkten Immunfluoreszenz-Technik fanden sie hohe Titer gegen Oberflächenmembranen von menschlichen Lungenkrebszellen. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe wurden bei vier verschiedenen histologischen Typen gefunden. CEA aber ließ sich nirgends nachweisen.

Jamasbi und Nettesheim (120) fanden zirkulierende Tumor-Antigene bei Mäusen mit ausgedehntem Plattenepithelkarzinom der Lunge. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe der Immunodiffusion. Diese Antigene wurden bei normalen und bei Fibrosakromtragenden Mäusen nicht gefunden. Das Molekulargewicht dieser Proteine bewegte sich zwischen 30 000 und 100 000. Studien mit Maus-Lökämie-Viren ergaben eindeutig, daß es sich hier nicht um Virusproteine handelt.

Gropp und Mitarbeiter (289) stellten ein Ziegen-Antiserum gegen Extrakte von menschlichem Bronchialkarzinomgewebe her. Absorbiert wurde mit Normalserum, Normallungengewebe, Erythrozyten und Thrombozyten. Das so entdeckte Antigen war nicht identisch mit einigen bekannten tumorassoziierten Antigenen wie

CEA, AFP, Ferritin, NCA, Alpha-2-PAG, Regan-Isoenzym, fetalem Antigen oder normalen Plasmaproteinen. Bei diesem Antigen handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von mehr als 500 000, es ist nicht stabil in 0,2 m Perchlorsäure und zeigt immunoelektrophoretisch eine Alpha- γ -2-Beweglichkeit. Versuche, dieses Antigen auch im Serum von Patienten mit Bronchialkarzinom nachzuweisen, schlugen fehl.

McIntire und Mitarbeiter (169) entdeckten ein Antigen, das mit menschlichem Bronchialkarzinom assoziiert ist. Sie nannten es LTAA (Lung tumor associated antigen). Das Antigen war in Lungenkrebsgeweben aller histologischen Typen, aber nicht Normal- und Fetalgeweben, anwesend. Kreuzreaktionen mit CEA, Ferritin, Laktoferrin, Coeruloplasmin, Beta-Onkofetalem Antigen und der alkalischen Plazentaphosphatase ergaben sich nicht. Die Autoren entwickelten einen RIA für dieses Antigen und führten Messungen im Serum von Patienten mit Bronchialkarzinom durch. Der Normalspiegel im menschlichen Serum wird mit 300 - 500 mikrogramm/ml für LTAA oder eine kreuzreagierende Substanz angegeben, gemessen mit dem Radio-Immuno-Assay. Doppelt bis dreifach erhöhte Werte zeigten sich vor allem bei Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Lunge. Die Serumspiegel waren auch sehr hoch, wenn es zu einer Tumorprogression kam. Die Autoren folgern aus ihren Befunden, daß LTAA einen guten zusätzlichen Tumormarker zum CEA darstellt.

2.2.4.7. (Nicht identifizierte) Antikörper beim Bronchialkarzinom

Joachim und Mitarbeiter (123) stellten durch immunhistologische Untersuchungen fest, daß die zelluläre Infiltration am höchsten beim Plattenepithelkarzinom und am niedrigsten oder fehlend beim Haferzellkrebs war. Zwischen Tumornekrose und Infiltration bestand keine Beziehung. Gearbeitet hat diese Gruppe mit der indirekten Immunofluoreszenztechnik. Plasmazellen zeigten eine Korrelation mit dem ausdifferenzierten Plattenepithel-

karzinom der Lunge. Immunglobuline aus dem Pleuraerguß beim Bronchialkarzinom reagierten mit Gewebekulturen, frischen Zellsuspensionen und verschiedenen Targetzellen vom Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom der Lunge, nicht aber mit Zellen von normaler oder fetaler Lunge. Ebenfalls keine Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte mit Gewebe, welches vom Haferzellkarzinom stammte.

Kay et al. (125) fanden, daß der Gehalt an Ig-G im Pleuraerguß beim Bronchialkarzinom viel niedriger ist, als in einem Pleuraerguß, der zum Beispiel durch Herzinsuffizienz oder Tuberkulose bedingt ist. Bei den anderen Immunglobulinen ergab sich in dieser Beziehung allerdings kein signifikanter Unterschied.

Sofen und Mitarbeiter (229) wiesen immunfluoreszenzoptisch bei Patienten mit fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom der Lunge Serumantikörper gegen kultivierte Tumorzellen nach. Keine Reaktion ergab sich mit Tumorzellen anderer Histologie beim Bronchialkarzinom oder bei Karzinomzellen anderen Ursprungs. Die Antikörper waren nur in der 19-S-Fraktion der Sephadex-G-150-Säule vorhanden, mit der quantitativen Immunfluoreszenz wurden sie als Ig-M-Antikörper identifiziert. Ig-G konnte nicht nachgewiesen werden, es wurden auch keine gegen die 7-S-Fraktion gerichtete Aktivität gesehen.

2.3. Eigene Untersuchungen

2.3.1. Methodik

2.3.1.1. Analytische Verfahren

2.3.1.1.1. Gesamteiweiß

Die Bestimmung des Gesamteiweißes erfolgte mit der Biuret-methode nach Weichselbaum (255). Die Messung wurde bei 546 mμ mit dem Spektralphotometer der Fa. Hitachi-Perkin-Elmer 139 beziehungsweise der Fa. Beckman durchgeführt. Es wurden 0,1 ml Serum, sowie 4,9 ml physiologische NaCl-Lösung und 5,0 ml Biuret-Reagenz angesetzt.

2.3.1.1.2. Zweidimensionale Doppeldiffusion nach Ouchterlony

Die Durchführung der Doppeldiffusion geschah nach den Vorschriften von Ouchterlony (198 und 199). Verwendet wurde ein 2%iger Difco-Agar (Fa. Difco, Detroit, USA) mit zusätzlich Cialit auf Objektträgern. Mit speziellen Stanzen (Fa. Boskamp, Hersel bei Bonn) wurden vorwiegend Rosettenmuster hergestellt. Sechs bis acht Löcher, konzentrisch angeordnet mit einem Durchmesser von zwei Millimeter wurden später gefüllt. Das zentrale Reservoir hat einen Durchmesser von zwei beziehungsweise vier Millimeter. Nach Füllung der Löcher mit dem jeweils angegebenen Serum beziehungsweise Antiserum schloß sich eine Diffusionszeit von 24 bis 48 Stunden an. Darauf wurden die Objektträger in physiologische Kochsalzlösung für 24 Stunden gewässert, sodann getrocknet, ebenfalls 24 Stunden, und mit Azokarmin-Lösung gefärbt. Die Entfärbung wurde mit einer Essig-Methanol-Lösung vollzogen. (1:10 V/V)

2.3.1.1.3. Radio-Immuno-Assay

Die Markierung erfolgte nach der Chloramin-T-Methode von Hunter (117) mit 125 -Jod (Na-Jodid der Fa. Hoechst AG, Frankfurt/Main). Es wurde eigenes gereinigtes AFP und CEA verwendet, die Bestimmung des Ferritins geschah nach den Vorschriften der Fa. Behringwerke, Marburg, die uns dankenswerterweise Ferritin-RIA-Kits zur Verfügung stellte. Das Vorgehen beim Ferritin-RIA wird unten gesondert dargestellt.

2.3.1.1.3.1.

Prinzip der AFP- und CEA-Markierung nach der Chloramin-T-Methode: Als mildes Oxidationsmittel führt Chloramin-T Jodid in das reaktive Jod über. Dieses wird je nach Reaktionsdauer und Konzentration in unterschiedlichem, molarem Verhältnis vorwiegend in Tyrosingruppen von Proteinen eingebaut. Die Reaktion kann durch ein Reduktionsmittel wie zum Beispiel Natriumdisulfid augenblicklich unterbrochen werden. Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei 7,5. Durch Testung müssen die geringsten Konzentrationen von Natriumjodid, Chloramin-T und Natriumdisulfid sowie die geringste Reaktionszeit ermittelt werden, um Schädigungen des zu markierenden Proteins und einen damit verbundenen Verlust an Immunreaktivität so klein wie möglich zu halten. Prinzip der AFP- und CEA-RIA-Bestimmung:

Vor der Markierung wurde die Menge von 1 mCi Na- 125 J im Versandgefäß mit (50-) 100 μ l Phosphatpuffer 0,5 M pH 7,5 verdünnt. Die Markierung wurde in 1 ml-Kunststoff-Reagenz-Gefäßen (Fa. Eppendorf, Hamburg) vorgenommen. Nacheinander wurden mit EPPENDORF-Pipetten folgende Substanzen zusammengegeben, wobei die Mischung vorsichtig auf einem Spezial-Schüttler (Fa. Eppendorf, Hamburg) durchgeführt wurde:

- 20 μ l 125 J als Na-Jodid = 0,2 mCi (1. Aktivitätsmessung) =
eingesetzte Ges.-Aktiv. (Fa. Telefunken)
- 10 μ l Phosphatpuffer 0,5 M pH 7,5
- 20 μ l Protein (AFP, CEA) = ca. 5 μ g in 0,05 M Phosphat-
puffer pH 7,5
- 20 μ l Chloramin-T (Fa. Merck, Darmstadt) (= 50 μ g in Phos-
phatpuffer pH 7,5)...nach Mischung Inkubation über
25 Sekunden, danach...
- 25 μ l Na-Disulfit (Fa. Merck) (= 12 μ g in 0,05 M Phosphat-
puffer pH 7,5)
- 200 μ l 0,05 M Phosphatpuffer mit 2% bovinem Serumalbumin
(BSA)

Reinigung des 125 J-markierten Proteins

Die nachfolgende Reinigung wurde zur Entfernung von nicht gebundener Aktivität (1. Säule) als auch zur Gewinnung einer homogenen markierten Proteinfraktion (2. Säule) vorgenommen. Folgende Säulen wurden am Tag vor der Markierung vorbereitet:

1. Säule (Sephadex G 50 Fine 1x15 cm): Einweichen von 5g Sephadex G 50 Fine für 6 Stunden in 0,07 M Veronal-Puffer pH 8,6. Nach Entgasen (Wasserstrahlpumpe) Gießen der Säule. Nachwaschen mit 10 ml des gleichen Puffers. Vor Benutzung der Säule wurde 1 ml Veronal-Puffer mit 2,5% BSA vorlaufen gelassen.
2. Säule (Sephadex G 100 für AFP bzw. Sephadex G 200 für CEA, 1,5x 35-40 cm): Einweichen von 5 g Gel in 0,07 Veronal-puffer pH 8,6 für 6 Stunden, nach Entgasen Gießen der Säule. Vor Benutzung wurde mit 50 ml Veronal-Puffer 0,1 M mit 0,1% BSA und 0,9% NaCl nachgewaschen.

Das gesamte Reaktionsgemisch des Eppendorf-Gefäßes wurde einschließlich eines Nachspül-Volumens auf die 1. Säule aufgetragen und in 1 ml-Fraktionen mittels eines Fraktions-

kollektors (Fa. LKB Produkter, Bromma, Schweden) mit Tropfen-zähleinrichtung in kleine EPPENDORF-Gefäße gesammelt, in die je 0,2 ml 0,07 M Veronal-Puffer mit 2,5 % BSA vorgegeben worden waren. Eluiert wurde mit 0,07 M Veronal-Puffer pH 8,6. Die Aktivitäten der Fraktionen wurden einschließlich der verlorenen Aktivität (Reaktionsgefäß, Pipettenspitzen) in einem mäßig empfindlichen Gammazähler (Fa. Telefunken) gemessen (2. Aktivitätsmessung). Die 1 - 2 Fraktionen des Proteinpeaks mit der höchsten Aktivität wurden anschließend ohne vorherige Einengung auf die 2. Säule aufgetragen, mit o. gen. Elutionspuffer eluiert, in 1 ml-Fractionen gesammelt und im Gammazähler gemessen (3. Aktivitätsmessung).

Nach dem aufgezeichneten Radioaktivitäts-Diagramm der Fraktionen wurden diese zu bestimmten Sammelfractionen (z.B. aufsteigender bzw. abfallender Schenkel oder Maximum des Diagramms) vereinigt und zur weiteren Testung verwandt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte nach eigenen Programmen auf einem elektronischen Tischrechner (HP 65, HP 41C).

Testung des 1. Antikörpers (Antikörper-Verdünnungskurve)

Prinzip: Die Antikörper-Verdünnungskurve dient der Ermittlung einer geeigneten Verdünnung des 1. Antikörpers für die Standard-Inhibitionskurve des RIA. Sie erfordert deshalb die Benutzung einer konstanten geeigneten Verdünnung des Tracers (markiertes Antigen) und des 2. Antikörpers, die im Ansatz der variablen Konzentration des 1. Antikörpers in einer geometrischen Verdünnungsreihe gegenüberstehen. Zunächst werden konstante Mengen der 1. Antikörper-Verdünnungsreihe mit konstanten Mengen des markierten Proteins zusammengegeben. Nach einer Inkubation von 24 Stunden (Raumtemperatur) werden die meist löslichen Immunkomplexe (125J-AFP-Anti-AFP-IgG bzw. 125-CEA-Anti-CEA-IgG) durch einen zweiten Antikörper (Anti-

Kaninchen-Gammaglobulin von der Ziege (Fa. Behringwerke, Marburg) bzw. vom Esel (Fa. Wellcome)) während einer weiteren Inkubationsphase von 24 Stunden bei R.T. zu größeren präzipitierenden Komplexen verstärkt, die zentrifugiert und nach Dekantierung des Überstandes im Gammazähler gemessen werden können.

Als geeignete Verdünnung des markierten Antigens wurde nach Vormessung und Berechnung auf eine Count-Zahl um 20 000 - 25 000 /min. und 100 μ l unter Messung in einem auch für den Radioimmunoassay später verwandten sehr empfindlichen Gammazähler (80 000 Wallac gamma counter, Fa. IKB) eingestellt. Für den 2. Antikörper wurde eine Verdünnung von 1:15 bzw. 1:20 verwandt.

Pro Röhrchen (Polystyren-Röhrchen 12 x 55 mm, Fa. Boll) wurden folgende Volumina pipettiert (Verdünnungspuffer: 0,01 M Phosphatpuffer + 1 % BSA + 0,15 M NaCl + 0,4 % EDTA-Titriplex, pH 8,2 eingestellt mit 1 N NaOH):

a) Total: 100 μ l markiertes Antigen

b) N-Wert (unspezifische Bindung):

100 μ l markiertes Antigen

400 μ l Verdünnungspuffer, sonst wie c ohne
1. Antikörper

c) Probe: 200 μ l RIA-Verdünnungspuffer + 5 - 10 %
Pferdeserum

100 μ l markiertes Antigen + 1/200 stabil.
Kan.-serum (Fa. Behringwerke)

100 μ l Antikörper der ermittelten Verdünnung

Nach sorgfältiger Mischung des Doppel-Ansatzes und Inkubation bei Raumtemperatur für 24 Stunden:

100 μ l 2. Antikörper

Nach erneuter Inkubation (24^h, R.T.) wurden die Röhrchen bei 3000 UpM (1000 g) für 30 Minuten bei R.T. zentrifugiert, dekantiert, für 10 Minuten auf den Kopf auf einen saugfähigen Karton gestellt und danach vorsichtig mit Filterpapierschmitzel innen bis etwa 0,5 cm oberhalb des Bodens ausgewischt. Danach erfolgte Zählung im Gammazähler für 60 oder 100 Sekunden pro Röhrchen. (Berechnung der Aktivitätsprozentwerte siehe unter Berechnung).

Standard-Inhibitionskurve (Standard-Verdrängungskurve)

Prinzip: Im Radioimmunoassay (RIA) konkurrieren markiertes und nicht markiertes Standard- bzw. Analysen-Antigen um freie Bindungsstellen an einer begrenzten Anzahl Antikörper. Die dabei entstehenden meist löslichen Immunkomplexe werden in einer zweiten Reaktion durch einen zweiten Antikörper, der gegen Immunglobuline der Spezies des ersten Antikörper-Bildners gerichtet ist, oder durch Immunkomplex-Fällung wie z. B. durch gesättigte Ammonium-sulfat-Lösung, Polyäthylenglycol-Lösung oder Zirconyl-Phosphat-Gel gefällt und können nach Dekantierung und Entfernung des nicht präzipitierten Überstandes (enthält nicht gebundene Aktivität) im Gammazähler gemessen werden. Die Standardmeßkurve oder Eichgerade wird durch die Standard-Inhibitionskurve dargestellt, an der die entsprechenden Analysenproben später abgelesen und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor zur Endkonzentration berechnet werden können. Die Standard-Inhibitionskurve errechnet sich aus der relativen Verdrängung des markierten Antigens vom Antikörper durch die in der Standardverdünnungsreihe fallende Konzentration des gewünschten Standards in bezug auf die

maximale Bindung von markiertem Antigen und Antikörper ohne Standard (= 100 %). Die dabei auftretende Bindung wird in Prozenten der Gesamt-Aktivität (=Total) als Bindungskapazität bezeichnet; sie liegt in Doppel-Antikörper-RIA-Systemen meist zwischen 20 und 35 %.

Folgende Volumina wurden als Doppelbestimmung angesetzt:

AFP-Radioimmunoassay:

- a) Total- und
- b) N-Wert wie oben beschrieben;
- c) Standard:

200 μ l	RIA - Verdünnungspuffer + 10 % Pferdeserum
100 μ l	Standard-Lösung in Verdünnungspuffer entsprechend einer geometrischen Reihe von 320 - 2,5 ng/ml bzw. als Leerwert ohne Standard
100 μ l	1. Antikörper der ermittelten Verdünnung
100 μ l	markiertes Antigen (Tracer) + 1/200 Kaninchen-serum (Fa. Behringwerke)

Nach Mischung auf einem VORTEX-Mixer (Fa. Bender & Hobein, München) und Inkubation (24^h , R.T.)

100 μ l	2. Antikörper der Verdünnung 1:15
-------------	-----------------------------------

Nach erneutem Mischen und Inkubation (24^h , R.T.) wurde wie oben beschrieben (Zentrifugation, Gamma-Zähler) verfahren. Bei den Analysenbestimmungen wurden statt Standard 100 μ l natives oder verdünntes Patientenserum verwandt.

CEA-Radioimmunoassay

- a) Total wie oben beschrieben
- b) N-Wert wie Leerwert ohne 1. Antikörper

- c) Standard: (geometr. Verdünnungsreihe von 160 - 1,25 ng/ml)
- 100 μ l RIA-Verdünnungspuffer
 - 200 μ l normales CEA-freies bzw. -armes Humanserum (NHS)
 - 100 μ l Standardlösung in Verdünnungspuffer

Leerwert:

- 200 μ l RIA-Verdünnungspuffer
- 200 μ l NHS

Analysenprobe:

- 200 μ l RIA-Verdünnungspuffer
- 200 μ l Analysen-Lösung (Patientenserum nativ oder verdünnt)

Zu Standard, Leerwert und Analysenprobe erfolgte Zugabe von 100 μ l 1. Antikörper in entsprechender Verdünnung

Nach Vorinkubation (6 - 7^h, 40^o C) erfolgte Zusatz von

- 100 μ l markiertes Antigen (Tracer)

Nach Mischung wie bei der Vorinkubation und Inkubation (16 - 24^h, R.T.)

- 100 μ l 2. Antikörper in 1:15 Verdünnung

Nach erneutem Mischen und einer Endinkubation (24^h, R.T.) wurde wie beim AFP-RIA verfahren.

Bei Berechnung der Konzentration der Analysenproben (siehe unter Berechnung) mußte im CEA-RIA die Ergebnisse durch 2 dividiert werden, um die unterschiedlichen Standard- bzw. Analysenvolumina zu korrigieren.

2.3.1.1.3.2. Serum-Ferritin-Bestimmung nach dem IRMA der BEHRINGWERKE AG

Es handelt sich um einen immunoradiometrischen Assay (IRMA), der eine Serum-Ferritin-Messung nach dem Prinzip der nicht-kompetitiven Bindung erlaubt. Angewandt wird ein "two-site solid phase"-Assay des "Sandwich"-Typs, dessen Basis als feste Phase eine Kunststoffkugel ist, an der Anti-Ferritin-Antikörper haften. Die Antikörper-feste Phase wird mit Standards und Serumproben, die Ferritin enthalten, inkubiert und dabei das Ferritin aus der Lösung quantitativ über den Antikörper an die feste Phase gebunden. Die Menge des an die feste Phase gebundenen Ferritins wird dann durch eine Reaktion mit 125-Jod-markiertem Anti-Ferritin-Antikörper erfaßt. Es bildet sich ein Antikörper-Ferritin-Antikörper-125-Jod-Komplex, welchen man auch "Sandwich" nennt. Die an die feste Phase gebundene 125-Jod-Aktivität wird bestimmt und ist ein Maß der vorhandenen Menge an Ferritin.

Der Assay umfaßt den Bereich von nominell 0 - 320 ng Ferritin pro Milliliter, seine maximale Genauigkeit liegt zwischen 10 und 120 ng Ferritin/ml.

2.3.1.1.3.3. Serum-Ferritin-Bestimmung, eigener Radioimmuno- assay

Vorgehensweise, Pipettierschema, Elutions-Chromatogramme, Antikörper-Verdünnungskurven, Standard-Inhibitionskurve und statistische Auswertung sind ausführlich unter Punkt 2.4.4.1. im Ergebnisteil beschrieben und dargestellt.

2.3.1.1.4. Berechnungen

Radioimmunoassay

Sämtliche Berechnungen bezüglich der Markierung (Abb.19,27), der Parameter der Antikörper-Verdünnungskurven (Abb.20,28), sowie für die Standard-Inhibitionskurven (Abb.21,29,30) für CEA und Ferritin wurden mit Hilfe laborinterner eigener Berechnungsprogramme für den Hewlett-Packard-Computer HP 65 und HP 41C ausgeführt.

Das Programm für die Markierung berücksichtigt die Werte für die verwandten Mikrogramm Protein, eingesetzte Aktivität (in μCi) und Zählraten (CPM) für den Background, Abfall (Verlust an der Säule), die Berechnung des prozentualen Verlustes und Umrechnung in μCi . Die mit einem Geiger-Müller-Zähldetektor ermittelten CPM pro Fraktion werden für den Eiweiss- und Salzpeak, sowie Vor-, Zwischen- und Nachfraktionen getrennt gepoolt berechnet (Sephadex G 50 fine-Säule).

Die Summe der Zählraten der aus dem Proteinpeak ausgewählten Fraktionen für die weitere Auftrennung werden sodann als eingesetzte Aktivität für die Folgesäule (Sephadex G 200) verwandt. Für diese zweite Säule werden getrennt die im aufgetrennten Proteinpeak gemessenen CPM der einzelnen Fraktionen gepoolt und den gepoolten Zählraten der Vor- und Nachfraktionen gegenübergestellt. Die nach entsprechender Testung als brauchbar erwiesenen Eiweissfraktionen des Tracers werden dann gepoolt als Gesamtaktivität in μCi umgerechnet und schliesslich nach Verdünnung des Tracers auf die Gebrauchskonzentration und über die zuvor ermittelte spezifische Aktivität (in $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein) als Einzelaktivität (nCi/ng Protein/ $100\mu\text{l}$ Tracer) berechnet.

Für die Antikörper-Verdünnungskurven wurden die Bindungsrate pro Fraktion als Prozent-Aktivität in Relation zur maximalen Bindung pro Röhrchen (T , maximal gemessene Aktivität pro $100\mu\text{l}$ Tracer) nach Abzug der unspezifischen Bindung (U), also als $B-N/T-N$ berechnet. Für die Standard-Inhibitionskurven errechnet sich die Bindungsrate pro Röhrchen durch den Quotienten aus gemessener Aktivität minus unspezifischer Bindung und der für den Assay ausgewählten, durch die Antikörper-

Verdünnung bedingten maximalen Bindung ohne verdrängenden Standard (B_0) minus unspezifische Bindung, also nach $B-N/B_0-N$ (jeweils in %). Die Berechnung der Standardverdrängungskurven wurde durch Verwendung des Logit-Log-Verfahrens nach Rodbard (214) durchgeführt, bei der eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Antigen-Konzentration und dem Logit der gebundenen Aktivität besteht:

Y (Logit) = A (Ordinatenabschnitt) + B (Steigung) · X (log Konzentration). Dabei ist Logit definiert als natürlicher Logarithmus des Quotienten aus prozentualer Bindung und 100 minus prozentuale Bindung:

$$\text{Logit } l = \ln p/100 - p$$

Die Ermittlung der gemessenen Konzentrationen in einem RIA erfolgte rechnerisch durch Berechnung der Logit-Log-Regressionsgeraden über deren Gleichung nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrate (L. Sachs 221) unter zusätzlicher Berechnung des linearen Korrelationskoeffizienten r , der Standardabweichung der Geraden $s_{y.x}$ und der Geradenparameter A und B .

Statistische Berechnungen

Sämtliche statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe labor-eigener Programme auf dem Hewlett-Packard-Computer HP 41C nach allgemeinen Formeln (L. Sachs 221) durchgeführt. Dazu gehörten die Ermittlung von Mittelwert, Median, Standardabweichung, Variationskoeffizient, sowie des 10. und 90. Perzentils und deren Signifikanzberechnungen (Tab. 8, 9) von Alters- und AFP-, CEA- und Ferritinwert-Verteilungen, ferner die Prüfung multivariater dichotomisierter Verteilungen von bis zu 6 Parametern (Geschlecht, Alter, Stadium, AFP, CEA, Ferritin, Tab. 10) und die Ermittlung von ROC-Kurven mit Prävalenz, positivem und negativem prädiktiven Wert und deren Prüfung im χ^2 -Test (Abb. 41), sowie die Ermittlung von Korrelationskoeffizienten (linear r , Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient r_s) für

den Vergleich von Serum-CEA-Konzentrationen, ermittelt mit dem CEA-CO- bzw. CEA-BC-RIA (Abb. 39). Daneben wurden zur Korrelationsberechnung und Signifikanzprüfung bei normalverteilten Kollektiven der T-Test, bei Abweichung der U-Test oder der Kolmogoroff-Smirnoff-Test verwandt.

2.3.1.2. Präparative Verfahren

2.3.1.2.1. Gewebsextraktion (siehe Tabelle 1)

Die einzelnen Gewebeproben wurden sofort nach der Operation (im Falle des Lungennormalgewebes: nach der Sektion) in Plastikfolien eingeschweißt, beschriftet, gewogen und bei -70°C in einer Labortiefkühltruhe (Fa. Köttermann in Hümigsen, Hannover, 2473/380V) eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Die Extraktion erfolgte dann mit gesammelten Einzelproben der gleichen Histologie (Plattenepithelkarzinom der Junge).

Stufenweise wurde aufgetaut: Am Morgen des Tages vor der Extraktion wurde das Gewebe in einer Kühltruhe mit nur -20°C Kühltemperatur gegeben, am Abend dann in einen Kühlraum mit 4°C . Am Tag der Extraktion tauten die einzelnen Gewebeproben schließlich bei Raumtemperatur vollständig auf.

Die Plastikfolien wurden entfernt, Blut und Bronchialsekret ausgewaschen. Die grobe Reinigung und Trennung von Tumorgewebe und umgebendem Normallungengewebe geschah mit einem Präparierbesteck. Mit Hilfe eines Wiegemessers erfolgte die erste Zerkleinerung, sodann folgte als nächster Schritt eine Gewebsverarbeitung mit dem Multimax (Fa. Braun, Melsungen, IEX 32). Es entstand ein rotbrauner Gewebsbrei. Durch Zugabe von etwas destilliertem Wasser mit 1:10 000 Cialitzusatz wurde die Zerkleinerung erleichtert. Mit einer Homogenisator (Virtus Gerät der Firma Cenco, Haan) wurde im Kühlraum bei 4°C das Gewebe noch feiner verarbeitet. Die Umdrehungsgeschwindigkeit der rhomboiden Schermesser betrug 15-20 000Upm. Portionen zu je 400 ml wurden homogenisiert.

Das Pottergerät (Fa. Braun, Melsungen, Typ 53022, bis 400 Upm) diente zur weiteren, noch feineren Aufschließung des Gewebestreifs. In 60-ml-Zylinder und mit Hilfe eines elektrisch betriebenen Pistills, der mit Teflon beschichtet war, wurde das Gewebe verarbeitet. Auch hier wurde mit sterilem destilliertem Wasser bis zu einem Verhältnis 1:2 verdünnt, um die Potterung zu erleichtern. Zum Schluß lag eine Gewebssuspension von ca. 3 ml Flüssigkeit pro g Gewebe vor. Diese Schritte wurden am Anfang einer jeden Extraktion ausgeführt.

In den folgenden Schritten wurde je nach Extraktionsart unterschiedlich verfahren.

Saliner Extrakt für:

LCES = Lungenkarzinom-Histologie Plattenepithel, verhornt und nicht verhornt, wurden zusammen verarbeitet.

LINE = NLE = Extrakte von normalem Lungengewebe

LCNE = LCEN = Extrakt von normalem Plattenepithelkarzinom der Lunge umgebenden Gewebe.

Perchlorsäureextraktion für:

LCEP I und LCEP II nach der Methode von Krupey et al. (145)

Auch hier wurde Plattenepithelkarzinom der Lunge verarbeitet. Die dritte Form der Extraktion wurde nach modifizierten Schritten, wie sie bei Meltzer/Leonhard (173) und bei Granlund und Ritts (188) angegeben sind, ausgeführt.

LCEAS I und LCEAS II wurden mit 3,0 m KCL und anschließend 50 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung extrahiert.

LC = Lungenkarzinom

2.3.1.2.2. Zentrifugation

Das saline Extrakt wurde hergestellt durch Zugabe eines gleichen Volumens physiologischer Kochsalzlösung wie die Suspension, die sich aus den vorhergehenden Schritten ergab. Bei 19 000 Upm für 90 min. bei 4°C (Gerät der Fa. Beckman L 5-65, Rotor Titan) wurde sodann zentrifugiert.

Der FCA-Extrakt wurde durch Zugabe dergleichen Menge an 1,2 m Perchlorsäure zur Gewebessuspension hergestellt. Nach dem Rühren der Suspension für 30 min. bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation mit dem Beckman-Rotor sw 19 000 Upm für 60 min. Der Überstand wurde daraufhin über ein Blauband-Papierfilter (Fa. Schleicher und Schüll, Nr. 589) von den groben Fettbestandteilen befreit.

Bei der KLC-Extraktion (3,0 m KLC-Lösung mit 0,01 m K-Phosphat-Puffer, pH 7,4) wurde ebenso zentrifugiert wie oben, dann erfolgte Dialyse mit fließendem Leitungswasser für 40 Stunden bei Raumtemperatur. Als nächster Schritt schloß sich die Zugabe von 50% gesättigter Ammoniumsulfatlösung an, das Gemisch wurde für 60 min bei 4°C inkubiert und gerührt. Es folgte eine Zentrifugation bei 50 000 G für 30 min, ebenfalls bei 4°C.

2.3.1.2.3. Dialyse

Dieser Dialyseschritt war für alle drei Extraktionsformen gleich. Der Überstand aus den vorhergehenden Zentrifugationen wurde in 60-80 cm lange Dialyseschläuche (Fa. Kalle, Wiesbaden, Kaliber 38) abgefüllt, mit Bindfaden dreifach verknotet und für 48 Stunden gegen fließendes Leitungswasser dialysiert.

2.3.1.2.4. Konzentrierung

Mit dem Amicon-System (Fa. Amicon, Oosterhout, Holland) wurde das Gesamtdialysat unter Zugabe von 0,02% NaH_3 als Bakteriostatikum über eine Ultrafiltrationszelle (UF 400-Zelle, 400 Volumen, UF-Membran PM 10, Durchmesser 72 mm, Retentionsgrenze bei ca. 12 500 Molekulargewicht) eingeengt. Auf diese Weise wurden bis zu 4 Liter von einer Extraktion bis auf wenige Millimeter konzentriert, wobei ein Vorratsgefäß (RS 4) von 4 Liter Kapazität der UF-Zelle vorge-

schaltet war. Die zwei bis vier Tage dauernde Konzentration wurde im Kühlraum bei 4° C vorgenommen und durch ein Sicherheitskontrollsystem (Endpoint-controller EC 20) vor unbeabsichtigter Überkonzentration geschützt. Bei 100 ml Endkonzentration der Ultrafiltrationszelle wurde über das Vorratsgefäß noch ein Liter steriles destilliertes Wasser für eine Enddialyse angeschlossen. Nach weiterer Konzentrierung bis auf ein Endvolumen von 70 - 80 ml wurde dieses aus der Zelle abgesaugt und für eine Stunde bei 10 000 G entsprechend 13 500 Upm mittels einer Zentrifuge (Fa. Christ, Osterode, Harz, Typ UJ 15 000) zentrifugiert.

2.3.1.2.5. Ultrafiltration

Nach Einengung wurde das Konzentrat vor der abschließenden Gefriertrocknung mit einem Druck von 10 kg/cm² (Stickstoff-Pressluft) durch drei hintereinander geschaltete Filter (davor noch ein Glasfaservorfilter) mittels eines Druckfiltrationsgerätes (Fa. Sartorius, Typ SM 16 223) gepreßt. Die Kapazität dieses Gerätes belief sich auf 20 ml (Durchmesser 25 mm, Filterdichte: 1,2; 0,6; 0,2 µw). Beim salinen Extrakt mußte auf die kleinste Filterdichte verzichtet werden, da sonst keine Ultrafiltration mehr möglich gewesen wäre.

2.3.1.2.6. Gefriertrocknung

Die nun erhaltenen Mengen (60 bis 80 ml) wurden in einem Gerät der Fa. Christ (Aichach-Oberbernbach, Typ 290) lyophilisiert. Hierzu wurden die eingeengten Volumina in Glasschalen mit einem Durchmesser von 20 cm und einer Höhe von 3 cm gefüllt und mit perforiertem Parcefilm die Behälter abgedeckt. Die Lyophilisierungszeiten bewegten sich zwischen 20 und 30 Stunden.

2.3.1.2.7. Chromatographie (siehe Abb. 3)

Gel-filtration (Molekularsieb-Chromatographie)

Zur Auftrennung von Tumorextrakt-Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden Sepharose- und Sephadex G-Typen verwendet (044, 049, 079)

Sepharose 6B ist ein perlförmiger Agarose-Typ mit 6% Agarose-Gehalt, einer Perlgrösse im gequollenen Zustand von 40-210 μ m und einer Proteinauftrennung hauptsächlich oberhalb der Trenncharakteristik der Sephadex G-Typen. Vorbereitung und Giessen der Säulen wurden sowohl bei der Sepharose 6B, als auch bei den Sephadex G-Typen nach Angaben des Herstellers (225) vorgenommen. (Fa. Pharmacia, Schweden)

Das gefriergetrocknete Pulver der Tumorextrakte wurde in 0,05 M Tris-HCl-Puffer gelöst (mit 0,1 N NaCl, pH 6,0) bis 2ml für 100 mg Pulver; als Bakteriestatikum wurde noch 0,02% NaN_3 zugegeben.

Daten und Masse der Sepharose-6B-Säule:

Säule: 2,5x90 cm; 6 ml Fraktionen; UV-Messung bei 280 nm; Papier-vorschub 10 mm/h; Auftrag: LCES, LCEP, LCEAS.

Sephadex G ist ein kugelförmiges polymerisiertes Dextragel zur molekulargewichtsabhängigen Trennung von Proteinen. Je nach G-Typ werden unterschiedliche Fraktionsbereiche für Proteine je nach Partikelgrösse und Quervernetzungsgrad der Gele erhalten.

Daten und Masse der Sephadex-G 200-Säule:

2,5x90 cm; 6 ml Fraktion; Messung 154/280 nm; Papier-vorschub 10 mm/h
Auftrag: 6B-Sammelfraktion, ohne 6B I und II Peak

Daten und Masse der Sephadex-G 100-Säule:

2,5x80 cm; 6 ml Fraktion; Messung bei 254 nm; Papier-vorschub 10 mm/h
Auftrag: G 200, Fraktion III

Die Säulene-elution geschah unter kontinuierlicher Messung der UV-Absorption (Fa. LKB, Bromma, Schweden, Uvicord I und II, Geräte).

Die 6 ml Fraktionen wurden mit Hilfe eines Fraktionskollektors (Fa. LKB, UltroRac) gesammelt. Diese Fraktionen wurden schliesslich je nach den verschiedenen Peaks zusammengegeben und eingengt. Dazu diente ein System

mit Kollodium-Hülsen (SM 132 000, Fa. Sartorius, Göttingen) aus Zellulose-Nitrat (15 x 75 mm) in Haltevorrichtungen (SM 16 311). Mittels Druckfiltration bei einem Vakuum von bis zu 500 mm Hg (Wasserstrahlpumpe) wurde die Konzentrierung durchgeführt. Die Einengungsdauer betrug je nach Fraktionsvolumen eins bis fünfzehn Stunden. Die eingeeengten Fraktionen wurden sodann in 3-ml-Röhrchen gefüllt und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren oder direkt auf eine Folgesäule aufgetragen.

Immunadsorption mit CNBr-aktivierter Sepharose 4 B (Affinitätschromatographie)

Zur abschließenden Reinigung und Isolierung wurde eine Affinitätschromatographie unter Verwendung von Cyanbromidaktivierter Sepharose 4 B verwandt. (012 ,043)

Prinzip: Aktive Cyanbromid-Gruppen haben wahrscheinlich unter Bildung von zyklischen und azyklischen Imidokarbonatgruppen mit den Hydroxygruppen der Sepharose reagiert. Diese Imidokarbonatgruppen sollen sich bei Reaktion mit Proteinen unter Bildung von kovalenten Bindungen mit deren primären Aminogruppen verbinden. Nach Bindung des gewünschten Proteins und Blockierung der restlichen aktiven Cyanbromidgruppen gehen anschließend über die Säule gegebenen Proteine bei Elution im alkalischen Milieu nur dann eine Bindung ein, wenn es sich dabei um homologe Antigene des fixierten Antikörpers handelt. Ist nach einer gewissen Elutionszeit die Säule von nicht immunologisch gebundenem Protein eluiert, dann läßt sich durch anschließende Elution mit einem stark sauren Puffer oder durch chaotrope Ionen die Antigen-Antikörper-Bindung wieder lösen und so das spezifisch gebundene Antigen wieder lösen und eluieren. Dieser Vorgang ist mehrmals wiederholbar.

Bei Herstellung und Betreibung der cyanbromidaktivierten Sepharose 4-B-Säule wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren (002). Pro Säule (1,0 x 10 bis 22 cm) wurden 10 - 15 Gramm cyanbromidaktivierte Sepharose 4 B als Pulver abgewogen und in 2 Liter 0,001 m HCL für 15 Minuten gewaschen. Dadurch wurden Zusätze wie Laktulose entfernt. 100 - 150 mg (10 mg/g Gel) Antiserum-IgG vom Kaninchen wurden in 100 ml 0,1 m NaHCO_3 mit 0,5 m NaCl pH 8,3 gelöst und mit dem bis auf 100 ml auf einer Nutsche (Größe 3, Fa. Schott, Mainz) abgesaugten Gel vermischt. Nach Auffüllen der Suspension auf 400 ml mit Na-Bikarbonatpuffer wurden sie auf vier 100 ml-Plastikfläschchen verteilt. Diese wurden nach Verschließen für zwei Stunden bei R.T. auf einem Horizontalrotator langsam Überkopf gedreht und inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper über der Nutsche mit Na-Bikarbonatkopfer ausgewaschen. Die restlichen reaktiven Gruppen des Gels wurden während einer Inkubationsphase (zwei Stunden bei R.T.) mit 1 ml Glyzin-Lösung pH 8,0 blockiert. Drei Waschzyklen mit 0,1 m Azetatpuffer pH 4,0 in 1 m NaCl bzw. 0,1 m Boratpuffer pH 8,0 in 1 m NaCl im Wechsel dienten zur abschließenden Reinigung des Gels von nicht kovalent gebundenen Antikörpern. Danach wurde das Gel in eine kleine Säule (1 - 1,5 x 15 - 20 cm) gegossen.

Zum Vorlaufen und zur Elution der unspezifischen Eiweißkörper der aufgegebenen Fraktionen wurde als Startpuffer 0,15 m NaCl in 0,02 m Na-Phosphatpuffer pH 7,5 mit 0,02 % NaN_3 (= PBS) verwandt. Die Elution wurde durch UV-Messung bei 280 nm mit einem empfindlichen Durchfluß-Spektral-Photometer DB (Fa. Beckmann Instruments, München) und einem linearen Potentiometerschreiber (Geschwindigkeit 20 " per Tropfen) kontrolliert.

Nach Elution und Poolen der Fraktionen des ersten Peaks (nicht gebundene Proteine) wurden noch für zwei Stunden mit

Startpuffer nachgewaschen. Danach wurde der Endpuffer (PBS + 2,0 mM KSCN, pH 7,3) angeschlossen und mit einer Geschwindigkeit von 10 "/Tropfen eluiert. Mit dem pH-Umschlag wurde die spezifisch gebundene Antigen-Fraktion in einem kleineren Peak eluiert. Die Sammel-Fraktionen 1 und 3 (spezifisch gebundenes Protein) wurden gepoolt, eingeeingt, entsalzt und nach Prüfung gefriergetrocknet.

DEAE-Zellulose-Anionenaustauscher-Chromatographie

Zur Auftrennung von Immunsereen wurde DEAE-Zellulose verwendet (Fa. Serva, Heidelberg). Die Kapazität beläuft sich auf 0,6 - 1,0 mÄquivalent/g in einem pH-Bereich zwischen 4,5 und 8,0. Im wesentlichen wurde beim Vorbereiten der Zellulose, Gießen der Säule, Auftragen und Gradientenwahl nach den Angaben von Knedel und Mitarbeitern (140 - 142) verfahren. DEAE-Zellulose wurde in 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0 mit 0,02 % Na-Azid mit leichtem Druck (Pressluft) unter kontinuierlicher Drucksteigerung bis 0,5 kg/cm² in Säulen vom Ausmaß 2,5 x 100 cm bis zu einer Höhe von 60 - 80 cm gepackt. Die brauchbaren absorbierten Antiseren wurden der DEAE-Zellulose-Chromatographie zur Gewinnung von reinen IgG-Fraktionen unterworfen, da dieser Immunglobulinanteil nach Testung stets die überwiegende Menge spezifischer Antikörper enthielt. Dazu wurden sie zunächst in Dialysierschläuche vom Kaliber 20 gefüllt und in einem 2-Liter-Becherglas für 18 - 24 Stunden bei 4° C gegen Startpuffer (0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0) dialysiert. Nach Dialyse wurden sie für 30 Minuten bei 15 000 UpH (10 000 g) zentrifugiert und anschließend auf die DEAE-Zellulose-Säule aufgetragen und wie beschrieben eluiert. Die ersten zwei bis drei gepoolten und konzentrierten Sammelfraktionen wurden nach Testung auf Reinheit der IgG-Fraktion und Aktivität des spezifischen Antikörpers vereinigt, in kleine Portionen zu 200 - 500 µl aufgeteilt und bis zur Benutzung bei -70° C aufbewahrt.

2.3.1.3. Herstellung von Antiseren

2.3.1.3.1. Immunisierung (Modifikation des Verfahrens nach Hijmans et al. (111))

Weißer Neuseeland-Kaninchen (weiblich, Gewicht zwischen 5 und 6 kg) wurden vor allen vier Pfoten subkutan immunisiert. 10 mg Tumorextrakt oder eine eingeeengte Fraktion von der Säule wurden in 0,5 ml PBS und 0,5 ml komplettes Freundsches Adjuvans (Zwei Injektionen und 0,5 ml inkomplettes Freundsches Adjuvans) im Abstand von einer Woche subkutan gegeben. Nach drei Wochen wurden zweimal wöchentlich intravenöse Booster-Injektionen von insgesamt 1 mg Protein in PBS in ansteigender Menge gegeben (0,05; 0,1; 0,2; 0,2; 0,4 ml).

Eine Woche nach der letzten Gabe wurden den Kaninchen Blutproben entnommen. Diese wurden eine Stunde bei 37° C und über Nacht bei 4° C inkubiert und dann zentrifugiert (3 000 UpM, 15 min.). Die Seren wurden anschließend in der Doppeldiffusion getestet. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen getötet (entblutet): Das Blut wurde wie oben beschrieben behandelt, dann abgesert und weiterverarbeitet.

Immunisierungsschema

Zeit	Antigen	Applikation
Beginn	0,5 ml gelöst und 0,5 ml komplettes Freundsches Adju- vans	subkutan alle Pfoten

Nach einer Woche	0,5 ml Ag-Lsg. und 0,5 ml inkomplet- tes Freundsches Adjuvans dazu	subkutan alle Pfoten
Nach vier Wochen	Zweimal wöchentlich ansteigende Mengen von Antigen-Lös- ung: 0,05 - 0,1 - 0,1 - 0,2 - 0,2 - 0,4 ml	intravenös
Nach acht Wochen		Entblutung der Kaninchen

Zur Erstimmunisierung wurde das Antigen in ein bis zwei Mil-
liliter physiologischer Kochsalzlösung gegeben. Die intrave-
nöse Immunisierung erfolgte mit steigenden Mengen einer KAl-
präzipitierten Antigen-Lösung folgender Herstellung:

2,5 ml gepufferte physiologische NaCl-Lösung mit 200 bis
1 000 mikrogramm Antigen, dazu 1,15 ml 1 n Bikarbonat-Lösung
und 2,5 ml 10 %ige KAl-Sulfatlösung (in Tropfen zugegeben).

Diese Suspension wurde über Nacht bei 4° C inkubiert und dann
für 30 min. bei 3 000 UpM (1 000 g) zentrifugiert. Das erhal-
tene Präzipitat wurde nach Dekantierung des Überstandes mit
3 ml gepufferter (Natrium-Phosphat pH 7,4) physiologischer
Kochsalz-Lösung versetzt und darin suspendiert. In 0,5 ml
Portionen wurden diese dann eingefroren.

2.3.1.3.2. Absorption der Antiseren

Bei fehlendem Nachweis von Antikörpern gegen Verunreinigungen
wurde dennoch mit lyophilisierten gepoolten Normalserum-

Proteinen in einer Menge von 2 - 4 mg/ml Antiserum absorbiert. Bei Nachweis von zusätzlichen Antikörpern gegen Hormalextrakt (Hormale Lange-HLE) wurde durch eine Absorptionsreihentestung im Ouchterlony-Verfahren diejenige Antigennmenge ermittelt, die zur Vollabsorption benötigt wurde. Die lyophilisierten Substanzen wurden in der entsprechenden Menge dem Antiserum zugesetzt und mit Hilfe eines Magnetrührers beziehungsweise Mixers in Lösung gebracht. Nach Inkubation von einer Stunde bei 37° C und über Nacht bei 4° C wurden die Antiseren bei 15 000 UpM (10 000 g) für eine Stunde zentrifugiert, dann dekantiert und erneut auf Verunreinigungen hin getestet. Die letzte Behandlung der gewonnenen Roh-Antiseren bestand in der Absorption mit A/B-Erythrozyten nach vorheriger Dekomplementierung (30 min. bei 56° C). Die Erythrozyten wurden in kleinen Mengen dem Transfusionsbeutel entnommen, welcher eine gewaschene Suspension enthielt. Nach drei- bis viermaligem Waschen mit steriler physiologischer NaCl-Lösung und anschließender Zentrifugation (20 ml Gläser, 5 min. bei 2 500 UpM entsprechend 700 g) wurde der Überstand jeweils mit einer Pasteur-Pipette entfernt. Die hämolysefreien gepackten Erythrozyten wurden in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit dem Kaninchen-Serum versetzt und gut durchgemischt. Diese Suspension wurde nach einer Stunde Inkubation bei 37° C rezentrifugiert, das absorbierte Antiserum mit Hilfe einer Pasteur-Pipette abgehoben und in ein anderes Gefäß gegeben. Die Absorptionen wurden unter mikroskopischer Kontrolle solange wiederholt, bis auch in der Vergrößerung keine sichtbaren Agglutinate mehr nachweisbar waren.

2.3.1.3.3. Reinigung der Antiseren

Siehe obige Beschreibung der DEAE-Zellulose-Anionen-Austauscher-Chromatographie!

2.3.2. Untersuchungsmaterial

2.3.2.1. Lungengewebe

Extraktion für LCES/I, für LCEP/I und für LCEN

Es wurden sechs Operationsresektate, jeweils drei verhornende und drei nicht verhornende Plattenepithelkarzinome der Lunge verwandt:

M.R./040710

Pflaumengroßer Tumor am rechten Unterlappen, mit Lymphangiomas carcinomatosa, wenig differenziertes Plattenepithelkarzinom der Lunge, Stadium I B oder T 1, N 1, M 0.

H.J./210112

Pflaumengroßer Tumor im sechsten Lungensegment rechts, ausgedehnte Lymphknotenmetastasen, nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom der Lunge, Stadium I B oder T 1, N 1, M 0.

S.E./300711

Ein Lungenlappen fast vollständig infiltriert, die regionalen Lymphknoten sind befallen, Plattenepithelkarzinom der Lunge, Stadium II B, T 2, N 1, M 0.

K.J./250607

Taubeneigroßer Tumor im linken Unterlappen, die Lymphknoten sind frei, verhornendes Plattenepithelkarzinom der Lunge, Stadium I A oder T 2, N 0, M 0.

H.F./151223

Rechte Lunge mit enteneigroßem Tumor nahe dem Hauptbronchus, eine Lymphknotenmetastase wurde nachgewiesen, verhornendes Plattenepithelkarzinom der Lunge im Stadium II B oder T 3, N 1, M 0.

K.H./291018

Linker Lungenunterlappen mit einem Knoten von vier Zentimeter Durchmesser, Lymphknoten frei, Lymphangiosis carcinomatosa, verhornendes Plattenepithelkarzinom im Stadium II A/B oder T 2, N 0, M 0.

Extraktion für LCEAS

Es wurden vier wie immer in allen Fällen unfixierte Operationspräparate verwandt -zwei verhornende und zwei nicht verhornende Plattenepithelkarzinome der Lunge:

J.J./030824

Tischtennisballgroßer Tumor im linken Segment sechs, die Lymphknoten sind lediglich anthrakotisch, Plattenepithelkarzinom der Lunge, Stadium I A oder T 1, N 0, M 0.

R.K./130415

Handariniengroßer Tumor im linken Lungenoberlappen, Lymphknoten befallen, polymorphes Plattenepithelkarzinom im Stadium II B oder T 2, N 1, M 0.

L.A./091228

Linker Lungenoberlappen mit Tumorf infiltration, Lymphknoten mitbefallen, gering verhornendes Plattenepithelkarzinom im

Stadium I B oder T 2, N 1, M 0.

G.E./010310

linker Lungenoberlappen mit tennisballgroßem Tumor, Lymphknoten lediglich anthrakotisch, nicht infiltriert, gering verhornendes Plattenepithelkarzinom im Stadium II A oder T 2, N 0, M 0.

Extraktion von normalem Lungengewebe (NLE)

R.M./211005

Diagnosen: Rezidivierende Magenulzera, cerebrale Blutung bei parietookzipitaler Fraktur rechts, altes subdurales Hämatom rechts, Schädelbasisfraktur, frisch mit Blutung in die rechte Kleinhirnhemisphäre.

Lunge: Bronchiektasen, Atelektasen, Pleurahyalinose, Lungenemphysem, Tracheobronchitis.

Extraktion für LCES/II und LCEP/II

Es wurden dreizehn unfixierte Operationspräparate, davon elf nicht verhornende und zwei verhornende Plattenepithelkarzinome der Lunge, verwandt:

V.S./041204

Mandarinengroßer Tumor im rechten Lungenoberlappen, Metastasen in den Hiluslymphknoten und im vorderen Mediastinum, nicht verhornendes entdifferenziertes Plattenepithelkarzinom der Lunge im Stadium III oder T 2, N 1, M 1.

H.P./201211

Kirschgroßer Knoten im rechten Mittellappen, Infiltration der peribronchialen Lymphknoten, nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom im Stadium I B oder T 2, N 1, M 0.

S.S./250207

Tumor im rechten Lungenunterlappen (Durchmesser 4 cm), Lymphknoten frei, gut differenziertes Plattenepithelkarzinom der Lunge, nicht verhornend, im Stadium II A oder T 2, N 0, M 0.

K.K./210207

Tischtennisballgroßer Tumor im rechten Lungenunterlappen, Lymphknoten befallen, gering differenziertes Plattenepithelkarzinom der Lunge im Stadium I B oder T 2, N 1, M 0.

G.L./190322

Linker Lungenoberlappen mit hühnereigroßem Tumor, Lymphknoten frei, völlig entdifferenziertes Plattenepithelkarzinom der Lunge, Stadium II A oder T 1, N 0, M 0.

S.K./270324

Walnußgroßer Tumor im rechten Lungenoberlappen, ein weiterer mandarinengroßer Tumor im Mittellappen, Lymphknoten frei, kaum verhornendes Plattenepithelkarzinom im Stadium II A oder T 3, N 0, M 0.

D.A./010212

Tumor im linken Lungenoberlappen (4 cm), Lymphknoten frei, Plattenepithelkarzinom der Lunge im Stadium II A oder T 1, N 0, M 0.

M.H./021011

Kirschgroßer Tumor in einem Segment des rechten Lungenoberlappens, Lymphknoten massiv befallen, Lymphangiosis carcinomatosa, nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom der Lunge im Stadium II B oder T 2, N 1, M 0.

M.J./120404

Rechter Lungenunterlappen mit walnußgroßem Tumor, Lymphknoten frei, nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom der Lunge, Stadium I A, T 1 - 2, N 0, M 0.

M.E./291111

linke Lunge mit Befall von Hauptbronchus und Unterlappen, Lymphknoten ohne Metastasen, Pleurakarzinose, nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom der Lunge, Stadium II A, T 3, N 1, M 0.

M.D./130313

linker Lungenunterlappen mit walnußgroßem Tumor, mehrere Lymphknoten infiltriert, nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom der Lunge im Stadium I B oder T 2, N 1, M 0.

K.K./241112

linker Lungenoberlappen mit hühnereigroßem Tumor, Lymphknoten nicht befallen, mäßig verhornendes Plattenepithelkarzinom im Stadium II A oder T 2, N 0, M 0.

K.W./111040

Walnußgroßer Tumor im rechten Lungenunterlappen, regionale Lymphknoten befallen, mäßig verhornendes Plattenepithel-

karzinom der Lunge im Stadium I B oder T 2, N 1, M 0.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß praktisch nur Bronchialkarzinome der Stadien I und II, ohne Metastasen und ohne organüberschreitendes Wachstum, zur Extraktion gelangten. Die Operationspräparate wurden nicht fixiert, wie es sonst in der Pathologie üblich ist, sondern nativ histologisch untersucht und sogleich tiefgefroren.

2.3.2.2. Patientenseren

Es wurden 251 Seren von 165 Patienten mit Bronchialkarzinom (131 männlich, 34 weiblich, m./w. $\hat{=}$ 3,9:1) im Alter von 36 bis 88 Jahren (Median = 62,1 Jahre, 80 % zwischen 47,8 und 73,6 Jahren) untersucht. Davon entfielen 39 Fälle auf den histologischen Typ des Plattenepithel-Ca, 19 Fälle auf das kleinzellige BC und 107 Fälle auf andere (Adeno-Ca, unbekannte Histologie).

Gemäß dem klinischen Stadium entfielen 10 Fälle auf Stadium I, 37 Fälle auf Stadium II, 19 Fälle auf Stadium III und 99 Fälle auf Stadium IV.

Bei den inoperablen Patienten erfolgte lediglich eine Blutentnahme, bei den operablen Patienten nach Möglichkeit neben einer präoperativen Probe ein bis zwei postoperative Verlaufskontrollen während der stationären Behandlung (um den 7. bzw. 14. postoperativen Tag).

Die Hativblutproben wurden innerhalb 6 Stunden nach der Entnahme bei 1000 - 1500 g für 10 ' zentrifugiert und die gewonnenen Seren bei -40°C bis zur Verarbeitung eingefroren. Die Serumproben wurden zur Bestimmung von AFP, CEA und Ferritin verwandt.

Als Vergleichskollektiv dienten 29 Seren von 25 Patienten mit benignen Erkrankungen/Tumoren und Lungenbefall (Hämangiom, Tbc, Zyste, Schwarte, Bronchiektasen, Pneumonie etc.) (männlich 16, weiblich 9) im Alter von 20 bis 75 Jahren.

($\bar{x}$ = 49 $\pm$ 17 Jahre)

2.4. Eigenergebnisse

2.4.1. Gewebeextraktion

Die einzelnen Verfahrensschritte der durchgeführten Gewebeextraktion mit physiologischer Kochsalzlösung (ICES, ICEN, NIE), mit KCl und Ammonium-sulfat-Füllung (ICEAS) und mit Perchlorsäure (ICEP) gehen aus dem Fluß-Diagramm der Abbildung 1 hervor. Eine Zusammenstellung der wichtigsten Daten der insgesamt 5 durchgeführten Extraktionen findet sich in Tabelle 1.

Wie schon unter Punkt "Material" beschrieben, wurden ausschließlich gepoolte Plattenepithelkarzinome der Lunge von chirurgischen Resektaten bei noch operablen Patienten (klinisches Stadium I und II) zur Tumorextraktion verwendet. Insgesamt wurden drei Tumorextraktionen vorgenommen, aus denen zwei saline Extrakte (ICES I und II), zwei Perchlorsäure-Extrakte (ICEP I und II) und ein KCl-Extrakt mit anschließender Ammonium-sulfat-Füllung (ICEAS) hervorgingen.

In den gepoolten Extrakten der Extraktionen 1 und 5 befanden sich 18 bzw. 20 verschiedene individuelle Tumorproben, in Extraktion Nr. 4 acht Proben. Zum Vergleich und eventuellen Absorption wurden zwei saline Normalgewebsextrakte (Nr. 2,3) hergestellt. Bei Nr. 2 handelte es sich um "Normalgewebe" von einem Lungentumor-Patienten, das nach mikroskopischer Untersuchung nicht vom Tumor befallen war (peritumoröses Normalgewebe, ICEN); bei Extraktion Nr. 3 um eine Gewebeprobe von einem Patienten mit Lungenemphysem, der an einer Hirnblutung verstorben war (NIE).

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, wurden für die einzelnen Extraktionen zwischen 0,5 und 3,0 Liter Inkubationsvolumen (nach Homogenisierung) mit einem verarbeiteten Gewebe-Feuchtgewicht zwischen 150 und 1100 g verwandt. Ein Vergleich der nach

kompletter Verarbeitung erhaltenen Endlyophilisat-Trockengewichte zeigt, daß nach Perchlorsäure-Fällung deutlich weniger Substanz erhalten wurde als nach saliner bzw. KCl/AS-Behandlung. Dabei bewegten sich die Prozentsätze des Quotienten aus Lyophilisattrockengewicht und Gewebe-Feuchtgewicht für die salinen incl. KCl/AS-Extraktionen zwischen 1,8 und 4,2 %, für die Perchlorsäure-Extraktionen jedoch nur zwischen 0,14 und 0,19 %, was weniger als 10 % der salinen Extraktionsausbeute ausmacht. Dieser Unterschied ist auf den Umstand zurückzuführen, daß die Perchlorsäure eine relativ starke Säure darstellt und bei der eingestellten Inkubationskonzentration (0,6 m) einen pH zwischen 1 und 2 aufwies, bei dem es zu einer irreversiblen Fällung des größten Teils der im Extrakt vorhandenen (Serum)Proteine bis auf bestimmte Glykoproteine (inklusive Membranglykoproteine) kommt. Das zeigte auch die Untersuchung der verschiedenen Gesamtextrakte in der Doppelimmunodiffusion auf Serumproteine: in den salinen Extrakten (einschließlich KCl/AS-Behandlung) waren nahezu sämtliche Serumproteine wie z. B. Albumine, verschiedene $\alpha_{1/2}$ -Globuline, Transferrin und Immunglobuline nachweisbar, während in den Perchlorsäure-Extrakten (LCEP) im wesentlichen nur eine Spur Albumin, mehr α_1 -Antitrypsin und sehr viel α_1 -Glykoprotein (Orosomucoid, saures α_1 -Glykoprotein) nachweisbar waren (Abb. 2). Ferner war in keinem Extrakt Alpha-Fetoprotein (weder in der Immunodiffusion noch radioimmunologisch) und zumindest im Ouchterlony-Test auch kein CEA nachzuweisen.

Zusätzlich zu den Normal- und Tumorgewebs-Extraktionen wurden noch 1,8 Liter Pleura-Exsudat von einem Patienten (Heidh.) mit Plattenepithelkarzinom der Lunge und einer radioimmunologisch gemessenen CEA-Konzentration von 850 ng/ml nach der hier beschriebenen Perchlorsäure-Methode extrahiert (Homogenisierungsschritte entfallen).

Tabelle 1

Zusammenstellung der verschiedenen Extraktionen mit Kurzbezeichnung, Inkubationsvolumina, Feucht- und Trockengewichten, sowie dem Trocken/Feuchtgewicht-Quotienten

Extraktions- nummer	Bezeichnung	Inkub.-Vol.	Feucht Gewicht	Trocken Gewicht	Quot. in Proz.
1					
Salin	TU-ICES I	2,4 l	884,2 g	26,9 g	3,04 %
PCA	ICEP I	1,4 l	515,8 g	0,73 g	0,14 %
Gesamt			1400 g		
2					
Salin	NO-ICEN	0,5 l	150 g	5,0 g	3,3 %
3					
Salin	NO-NLE	0,8 l	250 g	10,4 g	4,2 %
4					
Salin	TU-ICEAS	1,4 l	550 g	9,6 g	1,8 %
AS-Fällung					
5					
Salin	TU-ICES II	1,5 l	550 g	15,4 g	2,8 %
PCA	ICEP II	3,0 l	1100 g	2,1 g	0,19 %
Gesamt			1650 g		

Abbildung 1

Präparation der Tumorextrakte

Gepoolte Operationsresektate (Plattenepithelkarzinome der Lunge, verhornend und nicht verhornend), unfixiert untersucht und sogleich tiefgefroren



Zerkleinerung (Präparierbesteck, Mixer)



1 Vol Tumorgewebe + 2 Vol physiologische NaCl (ICES, LCEP) bzw. 3,0 M KCl (ICEAS)



Homogenisieren (Virtis-Homogenizer, 10 000 U/min; 4°C; 30 min)



Pottern (+ 1/3 Vol NaCl/KCl)



Saline Extraktion
(0,15 M NaCl)

KCl-Extraktion
Ammoniumsulfat-
Präzipitation
(3,0 M KCl)

Perchlorsäure-Extraktion
(+ 1 Vol 1,2 M PCA)

Inkubation

1 - 3 h, 4°C

1 h, 4°C

30 min, R.T.

Zentrifugation

50 000 G/60 min
4°C

50 000 G/90 min
4°C

1 000 G/30 min
R.T.

Präzipitat jeweils verworfen

Überstand

./.

./.



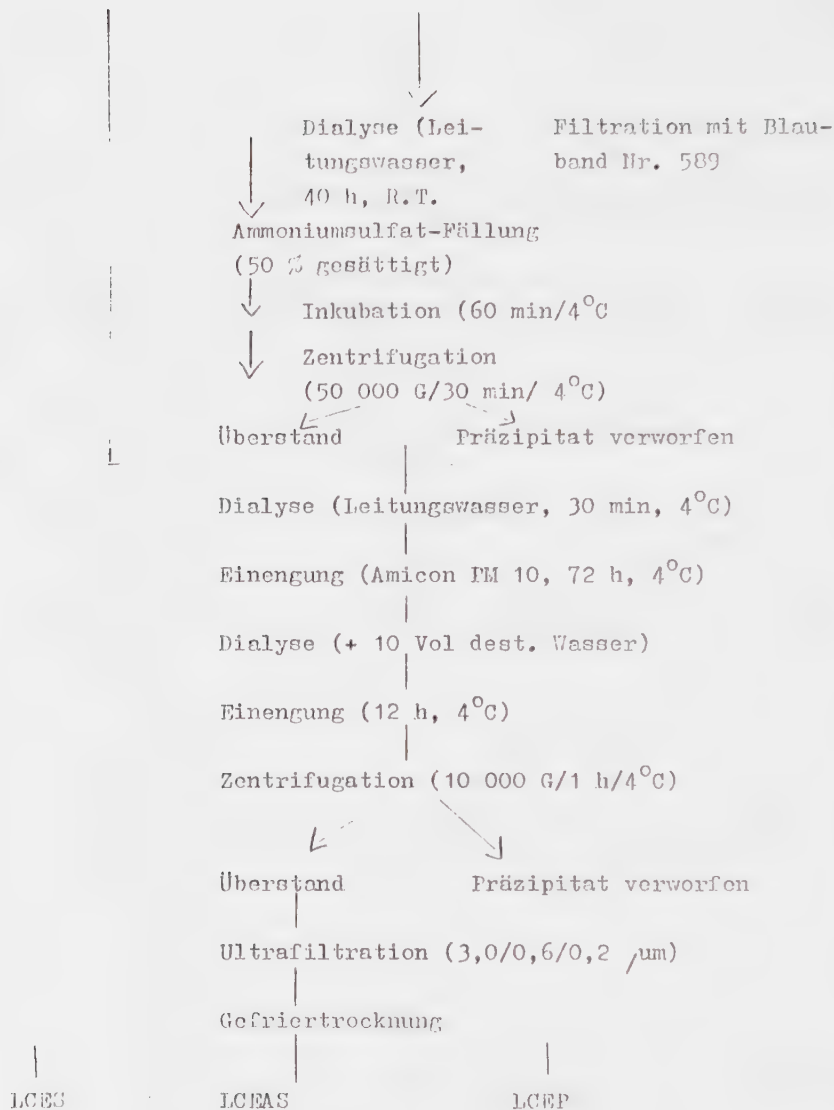


Abb. 1. Flußdiagramm des Vorgehens bei der Herstellung saliner, hypertoner KCl- und Perchlorsäure-Extrakte aus Bronchialkarzinom-Gewebe

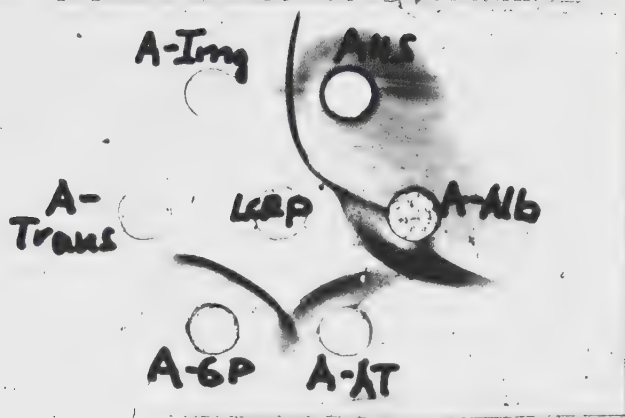


Abb. 2. Immunodiffusionsuntersuchung nach Ouchterlony von Lungentumorextrakt LCEP (zentrales Reservoir) im Ansatz gegen Anti-Humanserum (AHS), Anti-Albuminserum (A-Alb), sowie Antiseren gegen α_1 -Anti-Trypsin (A-AT), α_1 -Glykoprotein (A-GP), Transferrin (A-Trans) und gegen Immunglobuline (A-Img)

2.4.2. Gelfiltration

In Abbildung 3 ist ein Flußdiagramm der säulenchromatographischen Verarbeitung der verschiedenen Lungentumor-Extrakte wiedergegeben. In diesem Diagramm sind auch die zur Immunisierung am Kaninchen verwandten Fraktionen sowie die Verwendung erhaltener brauchbarer Antikörper-Fraktionen nach Reinigung über DEAE-Zellulose für eine Immunadsorption schematisch eingezeichnet.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, wurden sämtliche Extrakte über eine Sepharose 6B-Säule filtriert, wobei sich nach zwei initialen Fraktionen (6B/I, II) noch eine Folge schlechter unterscheidbarer Fraktionen ergab, die zu einer Sammelfraktion (6BΣ) vereinigt wurden. Diese Sammelfraktion konnte auf einer anschließenden Filtration über eine Sephadex G200-Säule besser unterteilt werden in 3 - 4 Fraktionen (G200/I, II, III, evtl. IV). Für erste orientierende Untersuchungen wurde dann noch die Fraktion III (+ IV) auf einer Sephadex G100-Säule weiterverarbeitet, wodurch es noch zu einer besseren Unterteilung in zwei weitere Fraktionen (G100/I, II) kam.

In Abbildung 4 ist eine typische Filtrationssequenz für den Extrakt LCES, in Abbildung 5 für den Extrakt LCEAS wiedergegeben. Ein Vergleich der Elutionsprofile von Abb. 4 und 5 ergibt, daß bei der Sepharose 6B-Filtration LCES fast gleichmäßig über die gesamte Breite verteilt erscheint, wohingegen LCEAS im Elutionsprofil deutlich nach rechts, d. h. zu den niedermolekularen Proteinen hin verschoben erscheint. Dieses Verhalten zeigt sich auch in der Gel-filtration mittels Sephadex G200 bestätigt; hier sind die Fraktionen G200/I und II von LCES deutlich höher als für LCEAS und machen ungefähr 50 % (LCES) bzw. 25 % (LCEAS) des Gesamt-Diagramms aus. Im LCEAS-G200-Profil zeigt sich zusätzlich noch eine weitere deutlich niedermolekulare

Fraktion (Peptide). Dementsprechend ist das LCEAS-Profil bei Auftrennung über die Sephadex G100-Säule wiederum größer, d.h. es repräsentiert eine größere Proteinmenge als die analogen Fraktionen von LCES. In diesem Zusammenhang ist wichtig festzustellen, daß beim Auftrag von LCES und LCEAS auf die Sepharose 6B-Säulen die gleiche Gewichtsmenge an Substanz (150 mg) verwandt wurde. Aus den beschriebenen Unterschieden folgt, daß bei der KCL-Extraktion/Ammoniumsulfat-Fällung offenbar entweder mehr höhermolekulare Proteine verlorengehen oder aber im Vergleich zur rein salinen Extraktion (physiologische Na-Cl-Lösung) durch die Prozedur native Proteine in kleinere Untereinheiten degradiert werden.

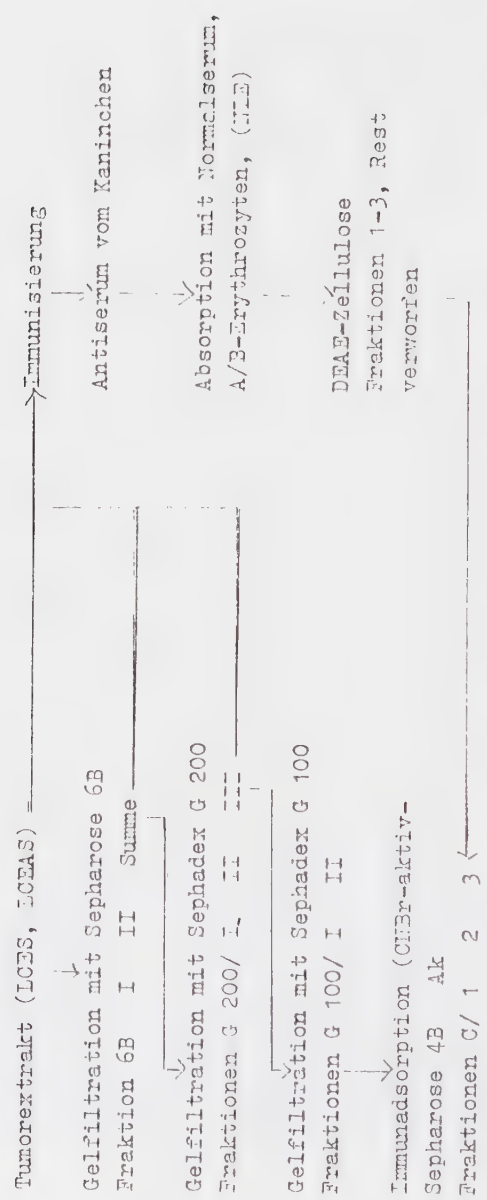
In Abbildung 6 ist ein typisches Elutionsdiagramm der Sepharose 6B-Gelfiltration von LCEP wiedergegeben. Wegen der nur sehr begrenzten Menge Extrakt wurde die Fraktionierung von LCEP auf diese Gelfiltration beschränkt. Aus der Abbildung geht hervor, daß LCEP zum überwiegenden Teil aus niedermolekularen Proteinen im Fraktionierungsbereich unter 10^5 Daltons (Fr. 6BIII) besteht, was mit dem starken Gehalt an niedermolekularen Serumproteinen wie saures α_1 -Antitrypsin und α_1 -Glykoprotein übereinstimmt (Mol.-Gew. um 50 000).

Abbildung 7 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm der Gelfiltration von Pleuraexudat-Perchlorsäure-Extrakt eines Patienten mit Lungenkarzinom, das zur Isolierung von CEA verwandt wurde. Die für die CEA-Präparation wichtige Fraktion konnte mittels Immunodiffusion als 6BIII (mit Spuren von CEA noch in 6BII) identifiziert werden. Diese Fraktion bzw. ihre weiterfraktionierte Unterfraktion (6BIII - G200/I) nach Sephadex G200-Filtration wurde für den Immunadsorptions-Reinigungsschritt mittels CNBr.-aktiv. Sepharose 4B und angekoppeltem Anti-CEA-IgG (Säule C 18) verwandt.

Über die Affinitätschromatographische Reinigung einiger Antigene wird im Kapitel über Antigene (2.4.4.) berichtet.

Abbildung 2

Schema der Säulenchromatographie



GELFILTRATION VON LUNGENKARZINOM-EXTRAKT (SALIN) - LCES

Sephacrose 6 B - Säule (2,5 x 80 cm)

Auflrag: 150 mg LCESI

6 ml - Frakt. / 21 ml / h

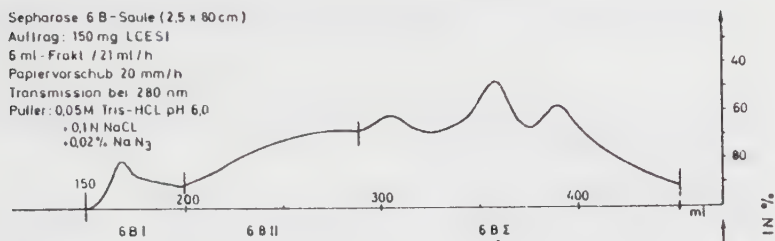
Papiervorschub 20 mm/h

Transmission bei 280 nm

Puffer: 0,05 M Tris-HCL pH 6,0

+ 0,1 N NaCl

+ 0,02 % NaN₃



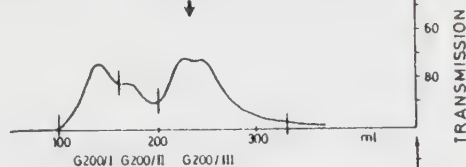
Sephadex G 200 - Säule (2,5 x 80 cm)

Auflrag: Fraktion LCESI/6 B I

6 ml - Frakt. / 12 ml / h

Papiervorschub 5 mm/h

Transmission bei 280 nm



Sephadex G 100 - Säule (2,5 x 80 cm)

Auflrag: Fraktion LCESI/G 200 / III

6 ml - Frakt. / 24 ml / h

Papiervorschub 10 mm/h

Transmission bei 254 nm

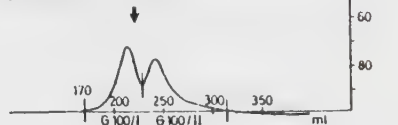


Abb. 4

GELFILTRATION VON LUNGENKARZINOM-EXTRAKT (AS-gel.)-LCEAS

Sephacrose 6 B - Säule (2,5 x 80 cm)

Auflrag: 150 mg LCEASI

6 ml - Frakt. / 30 ml / h

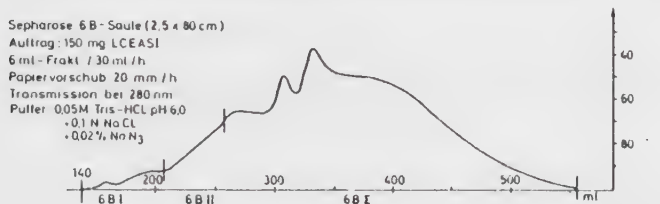
Papiervorschub 20 mm/h

Transmission bei 280 nm

Puffer: 0,05 M Tris-HCL pH 6,0

+ 0,1 N NaCl

+ 0,02 % NaN₃



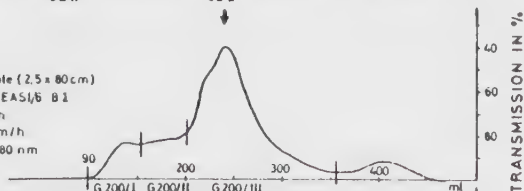
Sephadex G 200 - Säule (2,5 x 80 cm)

Auflrag: Fraktion LCEAS/6 B I

6 ml - Frakt. / 15 ml / h

Papiervorschub 5 mm/h

Transmission bei 280 nm



Sephadex G 100 - Säule (2,5 x 80 cm)

Auflrag: Fraktion LCEAS/G 200/III

6 ml - Frakt. / 24 ml / h

Papiervorschub 10 mm/h

Transmission bei 254 nm

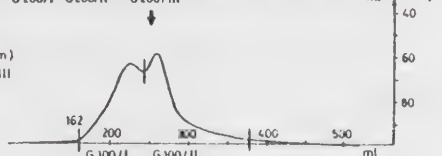


Abb. 5

GELFILTRATION VON LUNGENKARZINOM-EXTRAKT (PERCHLORS.) LCEP

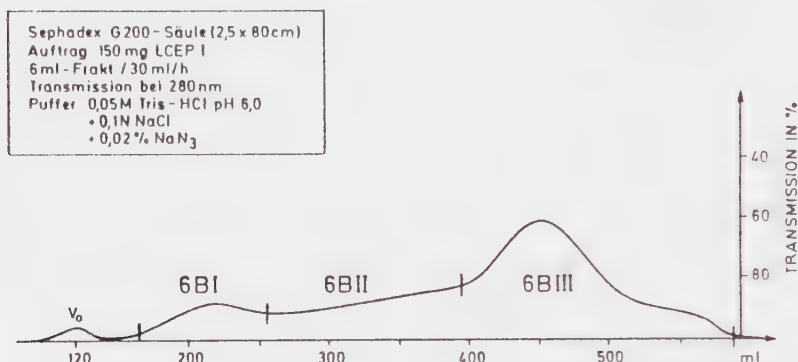


Abb. 6

GELFILTRATION VON PLEURAEXSUDAT-PERCHLORSÄURE-EXTRAKT (Pat. N., Lungenkarzinom)

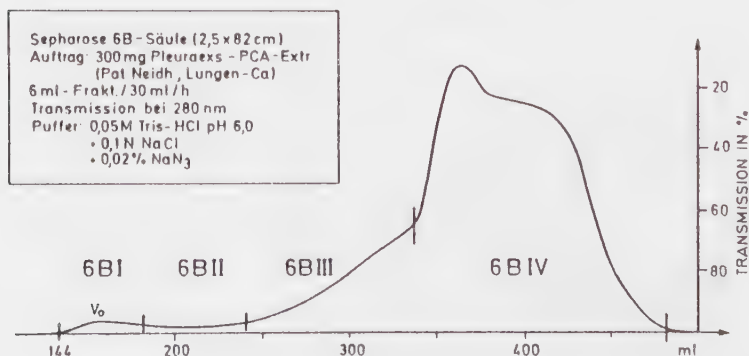


Tabelle 2

Kaninchen-Antiseren gegen Lungenkarzinom-Extrakt

Nr.	Bezeichnung	Immunisierungs-Substanz	Absorptions-Material	Bemerkungen
1	Josef	LCBP I	NS 10 mg/ml	1 schw. PL
2	Annick	LCBS I	NS 10 mg/ml	gu. As, 1 PL
3	Xaver	LCBS 6B II	NS 10 mg/ml	schw. As, 1 PL
4	Peter	LCBS G200/I	NS 10 mg/ml NLE-70 mg/ml	sehr gu. As, 2 PL
5	Beppo	LCBS G200/I	NS 10 mg/ml	gu. As, 2 PL
6	Stephan	LCBS G200/I	NS 10 mg/ml	gu. As, 2 PL
7	Nr. 6	LCBP I		schl. As
8	Nr. 7	LCBS G200/II		schl. As
9	Nr. 8	LCBS G200/III		schl. As
10	Moritz	LCEAS	NS 10 mg/ml	schw. As, 2 PL
11	Nr. 11	LCEAS 6B/I	NS 10 mg/ml	schl. As
12	Nr. 12	LCEAS 6B/II	NS 10 mg/ml	gu. As
13	Nr. 13	LCEAS G200/I	NS 10 mg/ml	gu. As
14	Nr. 14	LCEAS G200/III	NS 10 mg/ml A/B/O-Ery.	gu. As, 2 PL
15	Nr. 24	LCBP I		gu. As, Meh- rere PL
16	Nr. 32	CMA-BC Neid. 6B/III- C 27/1 C 18/3	NS/A/B-Ery. LE	sehr gu. As 2 PL

PL: Präzipitationslinie

As: Antiserum

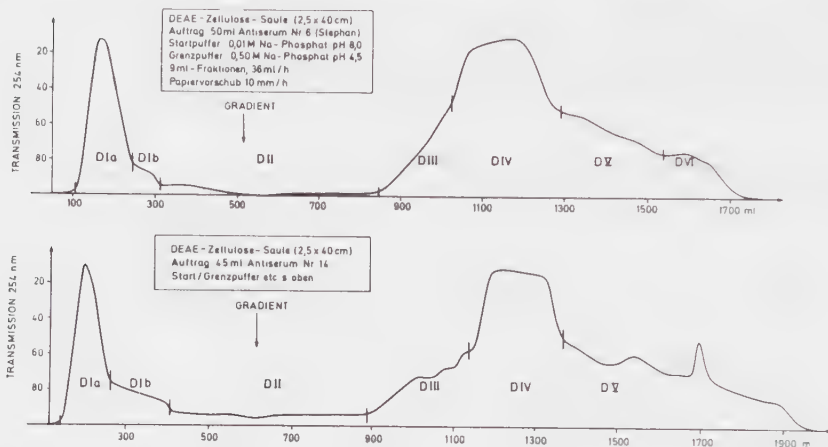


Abb. 8.

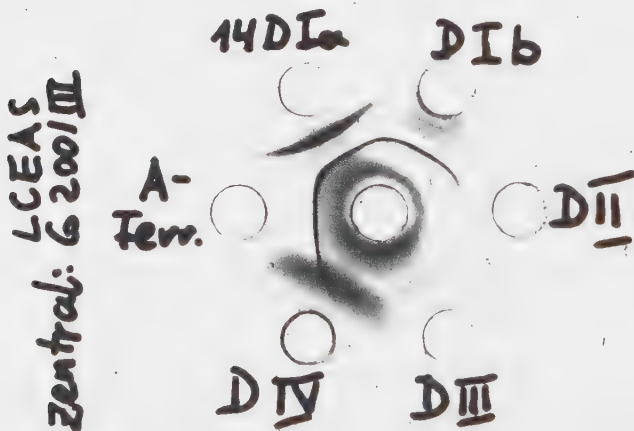


Abb. 9.

Immun_diffusionsuntersuchung (Ouchterlony) von Fraktionen des Antiserums Nr. 14 nach Chromatographie an DEAE-Zellulose im Ansatz gegen Fraktion G/200/III des Lungentumorextraktes LCEAS (zentral) und im Vergleich mit einem Referenz-Anti-Ferritinserum (links)

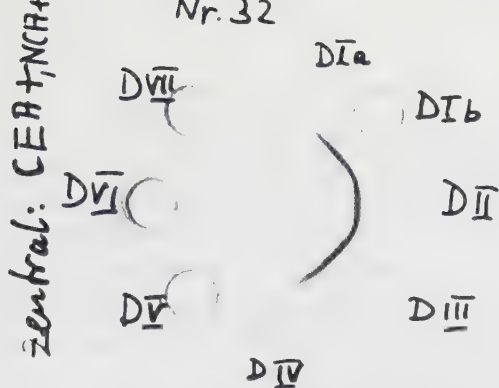


Abb. 10. Immundiffusionsuntersuchung von Unterfraktionen des an DEAE-Zellulose chromatographierten Antiserums Nr. 16 (32) im Ansatz gegen eine CEA- und NCA-Positive Kontrolle (zentral).

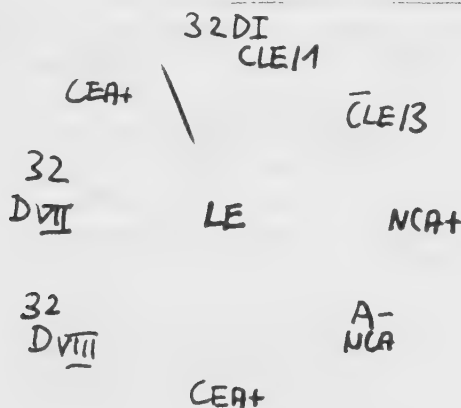


Abb. 11. Immundiffusionsuntersuchung von Unterfraktionen des an DEAE-Zellulose chromatographierten Antiserums Nr. 16 (32) sowie einer zusätzlich an normalen Lungengewebeextrakten (nicht)-absorbierten Fraktion D I (CLE/1 bzw. CLE/3) im Ansatz gegen normales Lungengewebeextrakt (LE, zentral) und eine NCA- bzw. CEA-haltige Kontrolle und im Vergleich mit einem Referenz-Anti-NCA-Serum (rechts unten)

Da es sich bei dem zur Immunisierung verwandten Material um hochgereinigtes CEA aus Lungenkarzinom/Pleura-Exsudat-Extrakt handelt und im hier dargestellten mittleren Antigenreservoir eine gemischte CEA/NCA-Präparation eingefüllt ist, handelt es sich hierbei offensichtlich um diese niedermolekulare mit CEA verwandte Substanz NCA, mit der ein nicht-absorbiertes polyclonales Anti-CEA-Serum praktisch immer mitreagiert. Diese Differenzierung der verschiedenen Antikörper-Anteile von Antiserum Nr. 16 gegen CEA und NCA ist in Abbildung 11 genauer untersucht. Hier wurde die Fraktion DI von Antiserum Nr. 16 (32) an einer NCA-haltigen Immunabsorptionssäule (CLE) noch nicht erschöpfend absorbiert; die obere Antikörperfraktion 32DI CLE/1 reagiert stark mit CEA, aber auch noch schwach mit NCA (normaler Lungenperchlorsäure-Extrakt LE im Zentralreservoir), während die von der Immunabsorptionssäule desorbierte Antikörperfraktion 32DI CLE/3 (oben rechts) nur noch die kreuzreagierenden Antikörper enthält, die mit einer anderen NCA-Präparation (NCA+) wie ein spezifisches Anti-NCA-Serum (unten rechts) reagieren; dieses reagiert natürlich nicht mit einer CEA-Präparation (CEA+ unten).

Abbildung 12 schließlich zeigt die Prüfung von erschöpfend absorbiertem Antiserum Nr. 16 (32). Eine immunologische Reaktion mit NCA (in LE enthalten) findet nicht mehr statt, aber eine deutliche Reaktion mit hochgereinigten CEA-Präparationen (Zentralreservoir, unten links). Demgegenüber zeigt ein monospezifisches Anti-NCA-Serum (Nr. 43 oben) eine deutliche Reaktion mit NCA (oben links) und keine Reaktion mit CEA (oben rechts).

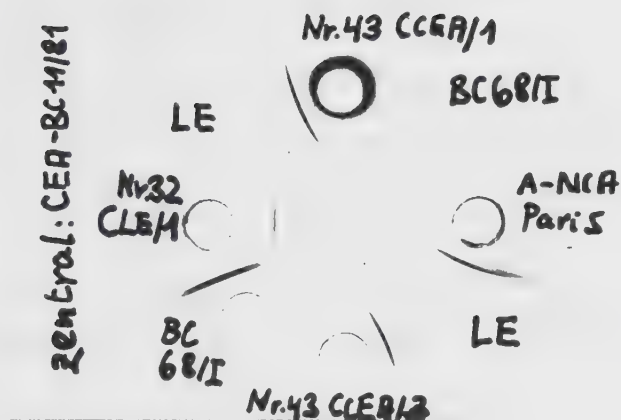


Abb. 12. Immunodiffusionsuntersuchung des nach Absorption an normalen Lungengewebsextrakt CEA-spezifischen Antiserum Nr. 16 (32 CLE/1) im Ansatz gegen normalen Lungengewebsextrakt (LE) und eine hochgereinigte CEA-Präparation (BC 68/I) im Vergleich zu einem spezifischen Referenz-Anti-NCA-Serum (Nr. 43 CCEA/1), einem nicht-absorbierten nicht-spezifischen Referenz-Anti-NCA-Serum (A-NCA-Paris) und einer Fraktion mit CEA kreuzreagierender Antikörper von Antiserum Nr. 43 (CCEA/3)

2.4.4. Lungenkarzinom-assoziierte Antigene (LCAA).

2.4.4.1 LCAA-1 (Ferritin)

Antiserum Nr. 2 (Annick) zeigte eine Präzipitationslinie in der Immunodiffusion gegen LCES, die auf die Unterfraktionen LCES 6B/II und G200/I begrenzt war (Abb. 13 a). Die zusätzlich angedeutete schwache und diffuse Anfärbung zwischen dem Antiserum und der Fraktion G100/II entspricht einer unspezifischen Reaktion dieser Fraktion mit dem Antiserum, da sie ebenfalls gegen Fraktion G100/I gerichtet erscheint. Die deutliche Präzipitationslinie von Antiserum Nr. 2 war zusätzlich identisch mit einer von zwei Präzipitationslinien, die Antiserum Nr. 3 (Xaver) und Nr. 4 (Peter), Nr. 5 (Beppo) und Nr. 6 (Stephan) ebenfalls aufwiesen (Abb. 13 c,d) und die eine deutliche Identitätsreaktion mit einem Referenz-Anti-Ferritin-Serum aufwies. Dieses Ferritin-Antigen wurde als lungenkarzinom-assoziiertes Antigen 1 (LCAA-1) bezeichnet. LCAA-1 konnte durch das Referenz-Antiferritin-Serum in den gleichen Fraktionen von LCES (6B/II, G200/I) nachgewiesen werden und deshalb aufgrund des Fraktionsbereiches einem Molekulargewicht zwischen $2 \times 10^5 - 10^6$ Daltons zugeordnet werden. LCAA-1 war nicht in LCEF nachweisbar und nur angedeutet in normalem salinen Lungenextrakt (NLE, Abb. 13 e). Eine Absorption des hochtitrigen Antiserums Nr. 4 (Peter) durch NLE bis zu einer Menge von 70 mg/ml führte zu einem vollständigen Verschwinden der Immunreaktion gegen NLE ohne wesentliche Beeinflussung der Reaktion gegen LCES/LCEAS in der Immundiffusion. Bei der Untersuchung von LCEAS-Unterfraktionen konnte LCAA-1 sowohl in den Fraktionen 6B/II und G200/I als auch in den Fraktionen G200/II und G200/III nachgewiesen werden. Dieser Befund als auch die oben erwähnte Umverteilung der Proteine in der Gelfiltration von LCES nach LCEAS sprechen

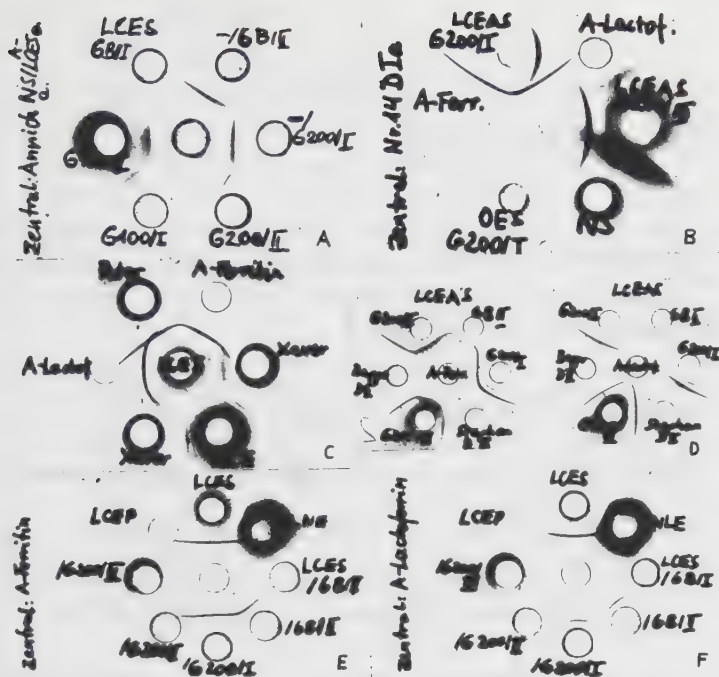


Abb. 13 Nachweis lungenkarzinom-assoziiierter Antigene in der Immunodiffusion (siehe Text); LCES = saliner, LCEAS = KCL- (Ammoniumsulfat-löslicher), LCEP = Perchlorsäure-Extrakt; Unterfraktionen nach Gelfiltration an Sepharose 6B (6B/I, II), Sephadex G200 (G200/I, II, III) und Sephadex G100 (G/100/I, II); OES = saliner Ovarialkarzinom-Extrakt; NS = humanes Normalserum; NLE = saliner Extrakt von normalem Lungengewebe.

Antiseren: A(anti)-Ferritin), A-Lakto(Ferrin), beide Referenzseren; Annick (NSa) = Antiserum Nr. 2 gegen LCES; Xaver = Antiserum Nr. 3 gegen LCES/6B/II; Peter, Beppo, Stephan = Antiserum Nr. 4-6 gegen LCES/G200/I; Nr. 14 Dia = Antiserum Nr. 14 gegen LCEAS G200/III (Fraktion I nach DEAE-Zellulose-Chromatographie)

LCEAS/G200/II

Abb. 14. Immunelektrophoretische Untersuchung der elektrophoretisch aufgetrennten Lungenkarzinom-Extrakt-Fractionen LCEAS G200/I und G200/II im Ansatz gegen Antiserum Nr. 14 DI (zentrale Antikörperrille)

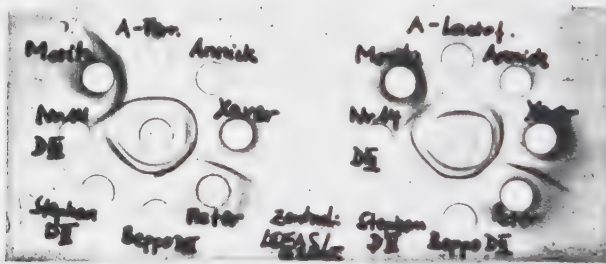
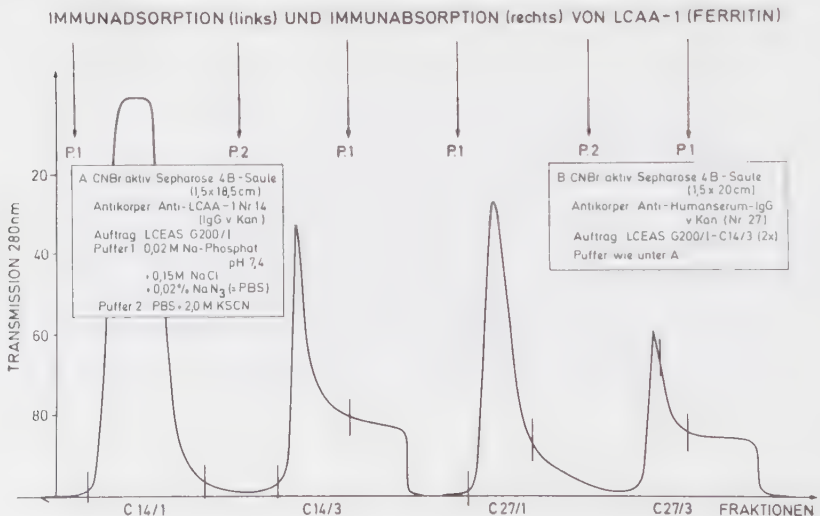


Abb. 15. Immundiffusionsuntersuchung von verschiedenen gegen LCEAS und LCEAS bzw. deren Unterfraktionen hergestellten Antisera im Ansatz gegen Fraktion LCEAS G200/I und im Vergleich zu einem Anti-Ferritin- bzw. -Laktoterrin-Serum (Antiserum siehe Tabelle 2)



2.4.3. Antiseren

Tabelle 2 gibt eine Zusammenstellung der nach der unter Methodik angegebenen Verfahren mit verschiedenen Substanzen hergestellten Antiseren in weiblichen weißen Neuseeländer-Kaninchen. Insgesamt wurden 16 Kaninchen zur Immunisierung verwandt. Als Immunisierungsmaterial wurden Tumorgesamtextrakt der drei verschiedenen Extraktionsverfahren (Nr. 1,2,6,10,15) benutzt, ferner Gelfiltrationen von LCES (Nr. 3,6,8,9,4,5) und LCEAS (Nr. 11,12,13,14). Zusätzlich wurde noch ein Antiserum gegen eine hochgereinigte CEA-Präparation aus Lungenkarzinom (Nr. 16) sowie gegen eine hochgereinigte Ferritin-Präparation aus Lungenkarzinom-Extrakt (Nr. 14) verwandt. Nach Abschluß der Immunisierung und Prüfung des Antiserums wurden die Kaninchen entblutet und das Serum gewonnen. Die dabei erhaltenen Serummengen lagen zwischen 50 und 120 ml. In der Regel wurden die Antiseren zunächst gegen Normalserum in der Immunodiffusion (Ouchterlony) geprüft und bei Nachweis von Präzipitátslinien gegen Normalserum bzw. auch bei fehlendem Nachweis aus Sicherheitsgründen mit 10 mg Normalserum-Lyophilisat/ml absorbiert. Bei vorheriger Positivität im Ouchterlony wurden die Antiseren anschließend wieder auf Nicht-Reaktivität gegen Normalserum überprüft. Antiserum Nr. 14 und Nr. 16 wurden zusätzlich mit A/B/O-Erythrozyten absorbiert, Antiserum Nr. 16 (Anti-CEA-BC-Serum) desweiteren noch mit einem lyophilisierten Perchlorsäure - Extrakt von normaler Lunge (IE, 10 mg/ml) zur Absorption von Kreuzreaktionen des Antiserums mit NCA (nonspecific crossreacting antigen). Die Ergebnisse der Immundiffusionsprüfung (Ouchterlony) über die immunologischen Reaktionen der Antiseren mit verschiedenen Lungentumorfractionen werden im folgenden Kapitel beschrieben.

Von den Antiseren Nr. 5, 6, 14, 16 wurden wegen des hohen Titors und auch zur Herstellung von Immunadsorptionssäulen die Immunglobulinfraktionen mittels DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie (DEAE-Zellulose) gewonnen, wobei sich nach Testung meist die ersten 2 - 3 Fraktionen als immunoreaktiv erwiesen, aber nur die erste Fraktion (IgG) rein war und für die Herstellung einer Immunadsorptionssäule verwandt wurde. Die nächste Abbildung 8 zeigt als ein typisches Chromatogramm die Auftrennung der Antiseren Nr. 6 und 14. In Abbildung 9 ist die Immundiffusions-Untersuchung der chromatographierten Fraktionen DIa/b - DIV von Antiserum Nr. 14 gegen die zur Immunisierung verwandten Fraktion ICEAS G200/III wiedergegeben. Aus der Abbildung zeigt sich, daß nur die Fraktionen DIa und Ib stark, Fraktion DII und DIII schwach und Fraktion DIV überhaupt nicht mehr gegen die Immunisierungssubstanz reagieren, wobei sich eine vollkommene immunologische Identität der gebildeten Präzipitatslinie mit dem Referenz-Antiferritin-Serum (A-Ferr.) ergibt. Zusätzlich zeigt sich noch eine Präzipitatslinie von DIa und DIb gegen das Zentralreservoir, die deutlich näher zum Antikörper-Reservoir liegt und deshalb einer immunologischen Reaktion mit einem niedermolekularen Antigen, z.B. Abbauprodukten des Antigens der Hauptlinie (gegen verborgene Antigen-Determinanten) entspricht. In Abbildung 10 ist die Untersuchung im Ouchterlony-Test der chromatographierten Fraktionen von Antiserum Nr. 16 ("Nr. 32") wiedergegeben. Hier sind die Fraktionen DIb - DIII deutlich und Fraktion DIV schwächer reaktiv, während Fraktion DV - DVII nicht mehr reagieren.

Zusätzlich kommt neben einer deutlich ausgebildeten Haupt-Präzipitatslinie noch eine zweite schwächere Linie zur Darstellung, die wiederum näher zum Antikörper-Reservoir gelegen ist und deshalb einem kleineren Antigen entspricht.

dafür, daß LCAA-1 durch die KCL/AS-Behandlung zu einem beträchtlichen Anteil zu Bruchstücken degradiert wurde. Da Fraktion LCEAS G200/III frei von einem zweiten für die LCAA-1-Isolierung störenden Antigen war (2. Präzipitationslinie von Antiserum Nr. 3, 4, 5 und 6), wurde es ebenfalls zur Immunisierung eines Kaninchens verwandt (Antiserum Nr. 14). Dieses Antiserum zeigte eine starke Präzipitationslinie mit immunologischer Identität mit dem Referenz-Antiferritin-Serum gegen LCEAS G200/I (Abb. 13b) sowie eine zweite deutliche Präzipitationslinie gegen die zur Immunisierung verwandte Fraktion LCEAS G200/III, die aufgrund der größeren Nähe der PL zum Antiserumreservoir und der stärkeren Biegung zum Antiserumreservoir als ein niedermolekulares Antigen (Bruchstück von LCAA-1) gedeutet werden muß.

Die zusätzliche Untersuchung mit einem Referenz-Antilaktoferrin-Serum schließt aus, daß es sich dabei um ein mit Laktoferrin kreuzreagierendes Antigen handelt. Eine Immunelektrophoretische Untersuchung der Fraktion LCEAS G200/I und G200/II mit der 1. DEAE-Zellulosefraktion von Antiserum Nr. 14 ergab je eine Übereinstimmende Präzipitationslinie gegen beide LCEAS-Fraktionen, die langgestreckt im α_2 -Mobilitätsbereich gelegen war. (Abb. 14)

Abbildung 15 (linker Teil) zeigt eine vergleichende Übersicht der wichtigsten gegen LCAA-1 (und LCAA-2) reagierenden Antiseren bzw. deren Fraktionen im Ansatz gegen LCEAS G200/I im Vergleich gegen ein Referenz-Antiferritin-Serum. Die immunologische Identitätsreaktion der Antiseren Nr. 2 (Annick), Nr. 3 (Xaver), Nr. 4 (Peter), Nr. 5 (Beppo), Nr. 6 (Stephan), Nr. 14 und Nr. 10 (Moritz) mit Antiferritin-Serum ist evident. Die zusätzliche Reaktion von Antiserum Nr. 3 mit Nr. 4 bzw. Nr. 10 mit Antiferritin-Serum beruht auf der noch nicht ausreichend durchgeführten Absorption dieser Antiseren mit Normalserum

Zur weiteren Reinigung von LCAA-1 wurde eine Immunadsorp-

tionssäule mit CNBr.-aktiv. Sepharose 4 B und angekoppelter Fraktion DI von Antiserum Nr. 14 (Nr. C 14) hergestellt. An dieser Säule wurden LCEAS G200/I-Fraktionen immunologisch absorbiert und die gebundenen Proteine anschließend mittels eines Desorptionspuffers (mit dem chaotropen Ion SCN^-) gelöst. In Abbildung 16 (linker Teil) ist ein solches typisches Elutions-Diagramm wiedergegeben. Anschließend wurden zwei bis drei dieser desorbierten Fraktionen (C14/3) zur Entfernung von unspezifischen mitadsorbierten und gelösten kontaminierenden Serumproteine über eine Immunadsorptions-säule (C27) gegeben (Abb. 16, rechter Teil). In diesem Fall wurde natürlich Fraktion C27/1 (nicht absorbierte Anteil) als hochgereinigtes LCAA-1 und Ausgangsfraktion für die Entwicklung eines Radioimmunoassays als Tracermaterial verwendet, während die gebundene Fraktion (C27/3) die kontaminierenden Serumproteine enthielt und nur zur Regenerierung der Säule desorbiert wurde. Abbildung 17 und 18 zeigen Immunodiffusions-Untersuchungen von 2 nachabsorbierten C14/3-Fraktionen von LCEAS G200/I, die zur Radiojodmarkierung mit J^{125} verwandt wurden. Die entsprechende Fraktion von 2/79 (Abb. 17, zentrales Reservoir) reagiert nur noch identisch mit Referenz-Antiferritin-Serum und zwei anderen Antiseren (darunter Antiserum Nr. 12/13), aber nicht mit Referenz-Antilaktoferrin-Serum, Anti-Chymotrypsin-Serum und einem Antiserum gegen Normalserumproteine. In Abbildung 18 zeigt die Präparation von 4/79 eine sehr starke Reaktion mit Referenz-Antiferritin-Serum sowie noch eine nur spurenhafte angedeutete Reaktion mit Referenz-Antilaktoferrin-Serum. In Abbildung 19 sind die Elutions-Chromatogramme einer Radiojodmarkierung von Fraktion LCEAS G200/I-C14/3-C27/1 (LCAA-1 7/81) der Präparation 4/79 wiedergegeben. 20 μg des Materials wurden mit 450 μCi Jod-125 nach der Chloramin T-Methode markiert. Das Markierungsgemisch wurde zunächst über eine Sephadex G50 fine-Säule

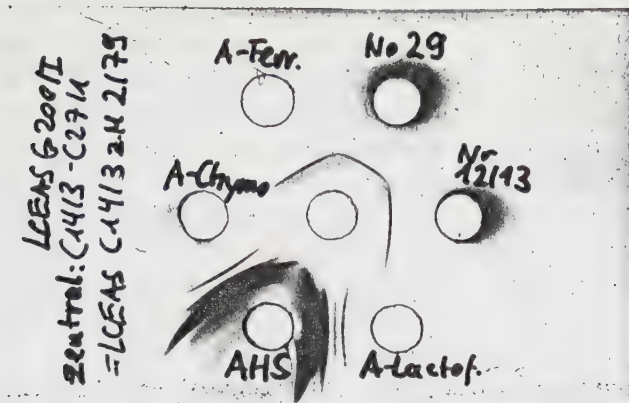


Abb. 17. Immundiffusionsuntersuchung von hochgereinigtem LCAA-1 (Ferritin) (Zentral Präp. 2/79: Fraktion LCEAS G200/I-C14/3-C27/1) im Ansatz gegen ein Referenz-(A-Ferritin) und zwei eigene Anti-Ferritinseren (Nr. 12/13 Nr. 29) sowie im Vergleich zu Referenz-Antiseren gegen Laktoferrin (A-Laktof.), α_1 -Chymotrypsin (A. Chymo) und normale Serumproteine (AHS)

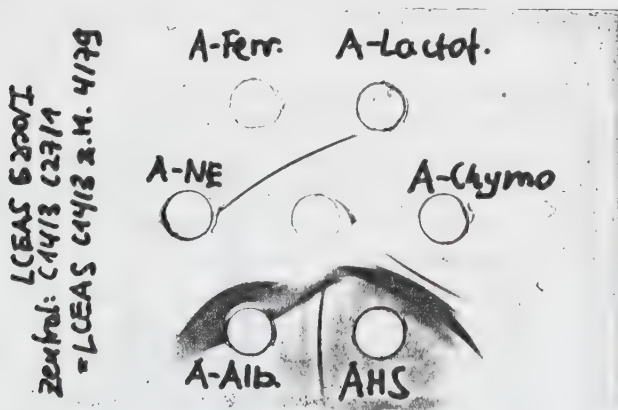


Abb 18. Immundiffusionsuntersuchung einer weiteren hochgereinigten LCAA-1-haltigen Fraktion (siehe Abb. 16, Präp. 4/79, zentral) im Ansatz gegen verschiedene Referenz-Antiseren gegen Ferritin, Laktoferrin, Chymotrypsin, humane Serumproteine (AHS), Albumin (A-Alb.) und gegen normalen Darmschleimhautextrakt (A-NE)

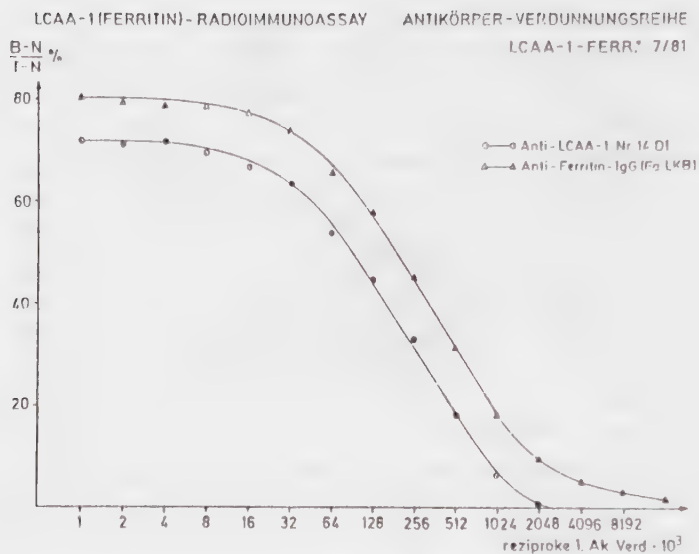


Abb. 19. Gelfiltrations-Diagramm von radiojodmarkiertem LCAA-1

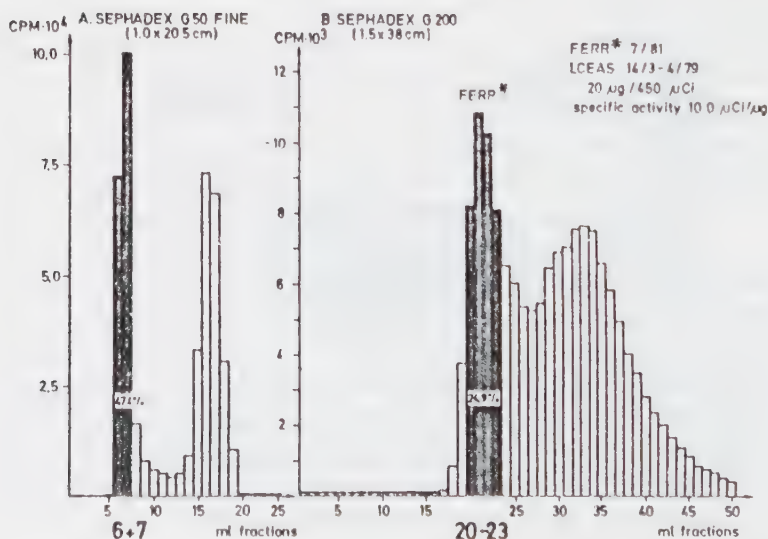


Abb. 20 Antikörperverdünnungsreihe (Ferritin-RIA)

vom freien Jod getrennt (Abb. 19, linke Seite).

47,4 % der Gesamtaktivität wurden sodann auf eine Sephadex G200-Säule aufgetragen und nach ihrem Molekulargewicht gefiltriert (Abb. 19, rechte Seite). Bei der nachfolgenden Testung von gepoolten Fraktionen gegen ein Anti-Ferritin-Serum in einer Antikörper-Verdünnungskurve erwiesen sich die in der Abbildung schwarz schraffierten Fraktionen 20 - 23 (entsprechend 24,9 % der Gesamtaktivität des Elutionsdiagramms) als besonders immunreaktiv und wurden deshalb zu einer Tracerlösung vereinigt, die auf eine Tracer-Konzentration 15 000 cpm in einem empfindlichen Gammazähler (Fa. LKB) gemessen und eingestellt wurde.

Abbildung 20 gibt die Diagramme von zwei Antikörper-Verdünnungskurven mit dem Tracer LCAA-1/Ferritin/ 7/81 unter Verwendung von Antiserum Nr. 14 (DI) und einem Referenz-Antiferritin-IgG (Fa. LKB) wieder. Die Referenzfraktion ist der stärkere Antikörper mit einer 50 %-Bindung bei einer Verdünnung von ca. 1/200 000, die Fraktion Nr. 14 DI benötigt für diese Bindung eine höhere Konzentration (Verdünnung 1/100 000).

In Abbildung 21 ist eine typische Standard-Inhibitions-kurve für den entwickelten Ferritin-Radioimmunoassay nach dem Logit-Log-Verfahren ausgewertet wiedergegeben. Unter Verwendung von Referenz-Antiferritin-Serum (LKB) und eines Referenz-Ferritin-Standards (Fa. Behringwerke, S₁-S₇) ergab sich bei einer Antiserum-Verdünnung von 1/200 000 (Arbeitsverdünnung) eine Bindungsaktivität von 35 % (B-N/T-N). Nach der Umwandlung der Bindungsaktivitäten der Standards in Logits besteht eine negative lineare Korrelation dieser Logits zum Logarithmus der zugehörigen Standard-Konzentrationen (Korr-Koeffizient $r = -0,399$). Der als Doppelantikörpertest entwickelte Radioimmunoassay (2. Antikörper Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege, Arbeitsverdünnung 1:20) wies eine Empfindlichkeit von

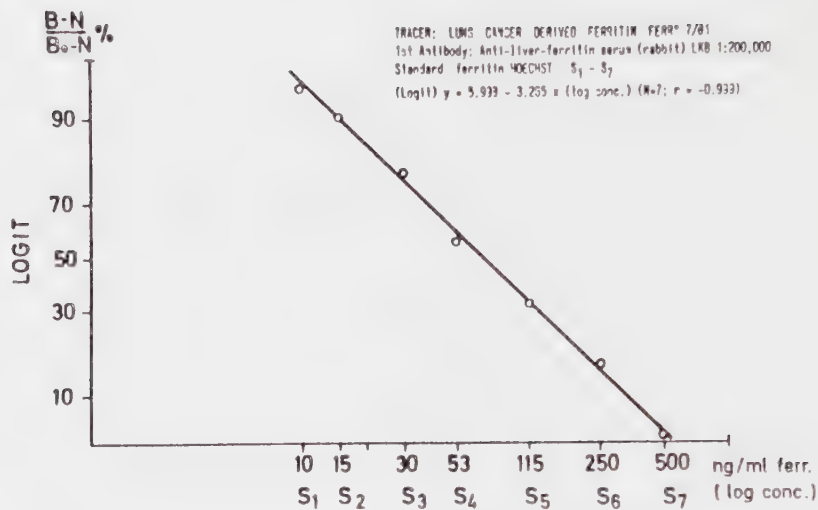


Abb. 21 LCAA-1/Ferritin-Radioimmunoassay
Standard-Inhibitionskurve nach Logit-Log-Transformation

Tabelle 3

Ferritin-Radioimmunoassay München

Pipettierschema (μ l)

Substanz	Total	N	O	Standard	Probe
P. + Pferde- serum 3 %	-	200	200	200	-
Puffer	-	200	-	-	200
Standard	-	-	100	100	-
Probe	-	-	-	-	100
1. Antik.	-	-	100	100	100
Ferritin	100	100	100	100	100
1. Inkubation, R.T., 16 - 24 h					
2. Antik.	-	100	100	100	100
2. Inkubation, R.T., 16 - 24 h					
Zentrifugation, R.T., 1000 g, 45 min					

10 ng/ml bei einem Arbeitsbereich zwischen 10 und 500 ng/ml auf. In Tabelle 3 ist das angewandte Pipettierschema dargestellt. Aus dem Schema ist ersichtlich, daß den Einzelproben Tracer und 1. bzw. 2. Antikörper noch 200 µl RIA-Puffer zupipettiert wurden. Diesem wurde für die Standard-Präparationen, die am Standard der Fa. Behringwerke geeicht wurden, noch 3 % Pferdeserum zugefügt. Der Radioimmunoassay wies eine Intra-Assay-Variation von unter 5 % ($\bar{x} = 36,3 \pm 1,4$, V.K. = 3,9 %, N = 10) und eine Inter-Assay-Variation bei 7 verschiedenen Testen von unter 10 % auf ($\bar{x} = 8,3 \pm 0,4$; V.K. = 5,1 %; $\bar{x} = 80,5 \pm 8,8$ ng/ml, V.K. = 8,8 %). Im Vergleich zum immunradiometrischen Ferritin-Test der Fa. Behringwerke, mit dem die meisten Serumbestimmungen durchgeführt wurden, bestand bei einem Vergleich von 28 Serumuntersuchungen im Bereich zwischen 50 und 1000 ng/ml eine lineare Korrelation von $r = 0,985$ ($s_{y.x} = 46,52$; $p < 0,001$; $r_s = 0,966$; $p < 0,001$).

2.4.4.2. LCAA-2 (Laktoferrin)

Antiserum Nr. 3 (Xaver), Nr. 4 (Peter) (Abb. 13 c), Nr. 5 (Beppo) und Nr. 6 (Stephan) (Abb. 13 d) bildeten in der Immunodiffusion noch eine zweite Präzipitationslinie (flaue Linie nahe dem Antiserum-Reservoir) in immunologischer Übereinstimmung mit einem Referenz-Antilaktoferrin-Serum gegen LCES und LCEAS. Dieses Antigen wurde als lungenkarzinom-assoziiertes Antigen LCAA-2 bezeichnet. Mit dem Referenz-Antilaktoferrin-Serum war LCAA-2 auf die Fraktionen LCES 6BII und G200/1 begrenzt (Abb. 13 f) und entsprach damit einem Molekulargewichtsbereich um $2 \times 10^5 - 10^6$ Daltons. In LCEAS war es ebenfalls in den analogen Unterfraktionen 6BII und G200/I sowie manchmal auch in G200/II, aber nicht in den Folgefraktionen einschließlich G200/III nachweisbar (Abb. 13 d). In der Immunelektrophorese wies LCAA-2 eben-

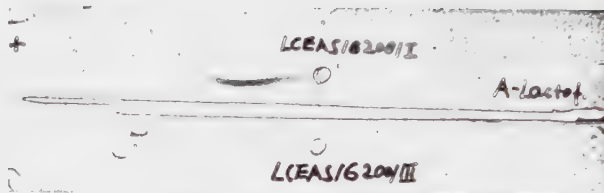


Abb. 22. Immunelektrophoretische Untersuchung von zwei Gel-filtrationsfraktionen von LCEAS (G200/I u. G200/III) im Ansatz gegen ein Referenz-Anti-Laktoferrin-Serum (zentrale Antikörperferrille)

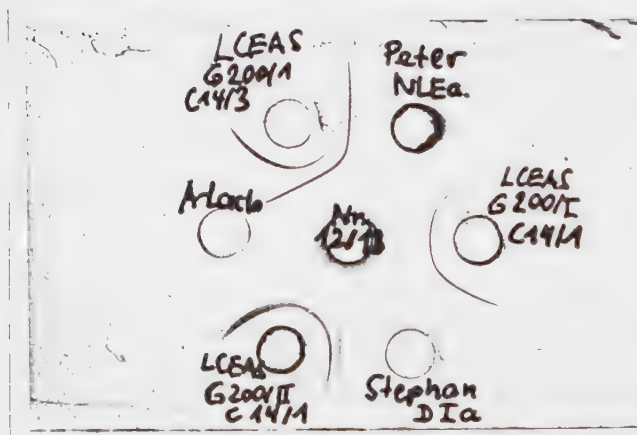


Abb. 23 Immundiffusionsuntersuchung der gepoolten Antiseren Nr. 12/13 (zentrales Reservoir) im Ansatz gegen verschiedene chromatographierte Fraktionen von LCEAS und im Vergleich mit einem Referenz-Anti-Laktoferrin-Serum (A-Lakto), Antiserum Nr. 4 (Peter) nach Absorption mit normalem Lungengewebeextrakt und Antiserum Nr. 6 (Stephan, DEAE-Zellulose-Fraktion DIA)

falls wie LCAA-1 eine α_2 -Mobilität auf (Abb. 22).

Eine deutliche Anreicherung und Reinigung von LCAA-2 war durch Verwendung der CNBr-aktiv. Sepharose 4B-Säule C14 (angekoppeltes Antiserum Nr. 14) möglich, wobei diesmal im Gegensatz zur Präparation von LCAA-1 die nichtbindende Fraktion C14/1 mit angereichertem LCAA-2 und noch spurenhafter Kontamination mit LCAA-1 verwendet wurde. (Abb. 23). Eine weitere Isolierung und Reindarstellung von LCAA-2 wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.

2.4.4.3. LCAA-3 (CEA-BC)

Antiserum Nr. 15 ("24") und Nr. 16 ("32") bildeten im NS/AB-Erythrozytenabsorbierten Zustand mit LCEP, LCES und LCEAS in der Immundiffusion zwei Präzipitationslinien, die in LCEP relativ ausgeprägter ausgebildet waren und keine Kreuzreaktionen mit den Referenz-Antiferritin- bzw. Antilaktoterrin-Seren sowie auch nicht mit einem Referenz-Antichymotrypsin-Serum aufwiesen (Abb. 24). Nach Absorption mit Lungen-Perchlorsäure-Normalgewebeextrakt blieb nur die äußere Linie übrig, die mit einem Referenz-Anti-CEA-Serum eine identische Präzipitationsreaktion zeigte und das entdeckte Antigen damit als CEA auswies. Dieses Antigen wurde als LCAA-3 bezeichnet. Radioimmunologisch konnte CEA in LCEP I mit einer Konzentration von 5500 ng/ml in einer Lösung von 25 mg LCEPI/ml nachgewiesen werden; demgegenüber enthielt LCEAS in einer Lösung von 50 mg/ml nur eine CEA-Konzentration von 716 ng/ml (Relation CEA-Gehalt in LCEAS zu LCEP I wie 1 : 15,4). Aus der Relation von CEA-Gehalt in LCEAS zu LCEP I von 1 : 15,4 erhellt die besondere Bedeutung der Anreicherung von CEA durch das Perchlorsäure-Verfahren.

Für die Präparation von CEA zum Aufbau eines CEA-Radioimmunoassays wurde jedoch der Pleura-PCA-Extrakt Neid. verwandt. Da-

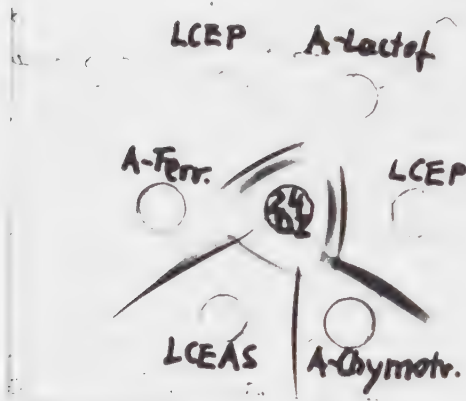


Abb. 24. Immundiffusionsuntersuchung von Antiserum Nr. 15 ("24", gegen LCEP, zentral) im Ansatz gegen LCEP und LCEAS und im Vergleich mit Referenz-Antisera gegen Ferritin, Laktoferrin und α_1 -Chymotrypsin

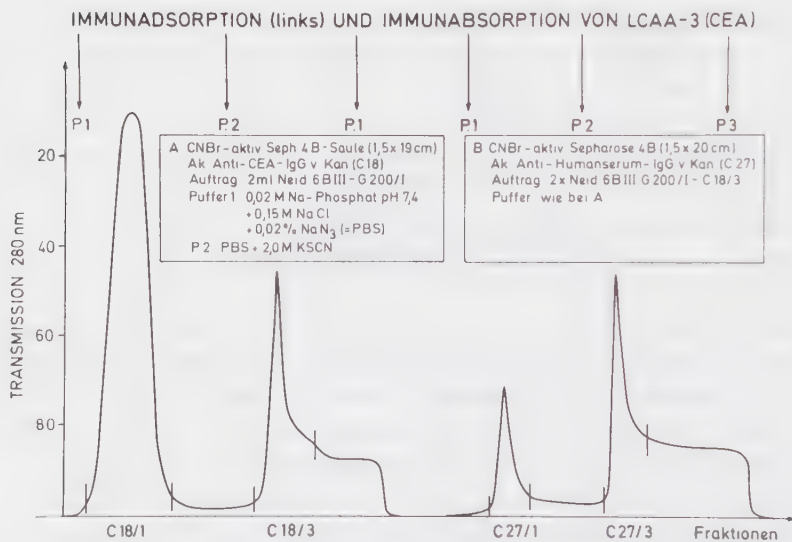


Abb. 25.

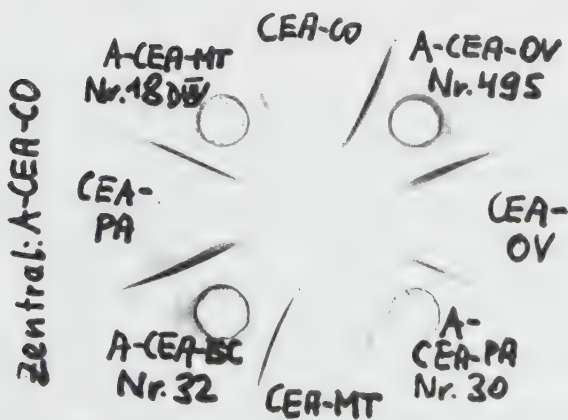
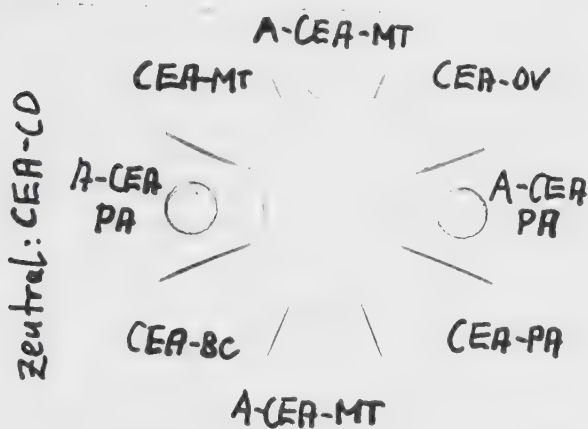
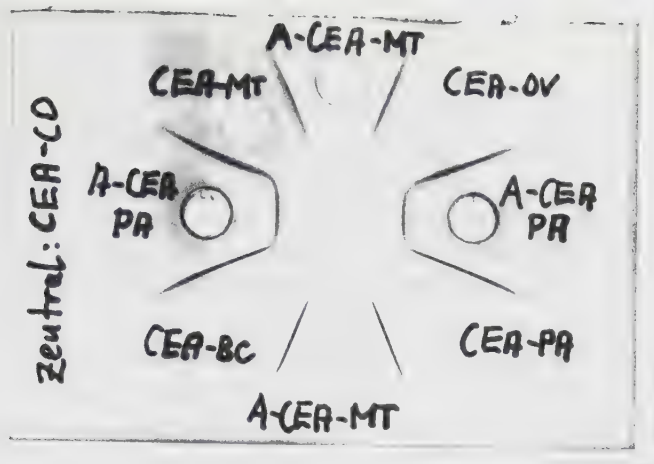


Abb. 26. Immundiffusionsuntersuchung von verschiedenen hochgereinigten CEA-Präparationen (CEA-CO = Kolonkarzinom-CEA, CEA-OV = Ovarialkarzinom-CEA, CEA-PA = Pankreaskarzinom-CEA, CEA-BC = Bronchialkarzinom-CEA, CEA-MT = Mammakarzinom-CEA) im Ansatz gegen die entsprechenden homologen Anti-CEA-Seren (A-CEA-CO, A-CEA-OV, A-CEA-PA, A-CEA-BC, A-CEA-MT)

zu wurde der Extrakt mittels Gelfiltration an Sepharose 6B chromatographiert und die immunologisch positive Fraktion 6BIII auf einer Sephadex G200-Säule weiter vorgereinigt. Abbildung 25 zeigt das Chromatogramm der Immunabsorption einer Neid-6BIII-G200/I-Fraktion an einer CNBr.aktiv. Sepharose 4B-Säule mit angekoppeltem Anti-CEA-IgG (C 18). Zwei der hoch angereicherten Fraktionen C 18/3 wurden anschließend auf einer CNBr.aktiv. Sepharose 4B-Säule mit angekoppeltem Antihumanserum-IgG v. Kaninchen (C 27) immunabsorbiert, d.h. von begleitenden kontaminierenden Serumproteinen gereinigt. Diese Endpräparation von LCAA-3 (= CEA-BC) wurde als Ausgangsmaterial für eine Radiojodmarkierung verwandt. Sie zeigte in der Immunodiffusion (Abb. 26, a, b, c,) im Vergleich mit anderen Referenz-Organ-CEA-Präparationen (CEA-MT = Mammakarzinom-CEA, CEA-PA = Pankreaskarzinom-CEA, CEA-CO = Colonkarzinom-CEA, CEA-OV = Ovarialkarzinom-CEA) und mit verschiedenen Anti-Organ-CEA-Antiseren (A-CEA-CO, A-CEA-MT, A-CEA-PA, A-CEA-OV, A-CEA-BC = Antiserum Nr. 16/"32") eine immunologische Identitätsreaktion und war frei von kontaminierenden Proteinen.

Abbildung 27 zeigt die typischen Gelfiltrations-Chromatogramme eines Jodierungs-Experimentes von CEA-BC (LCAA-3). Ca. 13 μ g Protein wurden mit 300 μ Ci nach der Chloramin T-Methode markiert. Anschließend wurde das Markierungsgemisch auf einer Sephadex G50 fine-Säule von freiem Jod getrennt, wobei etwa 58 % des Jods in das Protein eingebaut worden waren. Danach wurden die gepoolten Fraktionen 6 und 7 (schraffierte Fläche, linkes Diagramm) auf eine Sephadex G200-Säule aufgetragen und weiter aufgetrennt. Von den erhaltenen Fraktionen erwiesen sich nur die höhermolekularen Fraktionen 21 - 30 und davon die Fraktionen 24 - 27 als am stärksten immunoreaktiv in der Antikörper-Verdünnungsreihen-Testung, während die Folgefraktionen durch Markierung und Oxidations/Reduktionsmittelbehandlung geschädigtes Protein darstellen.

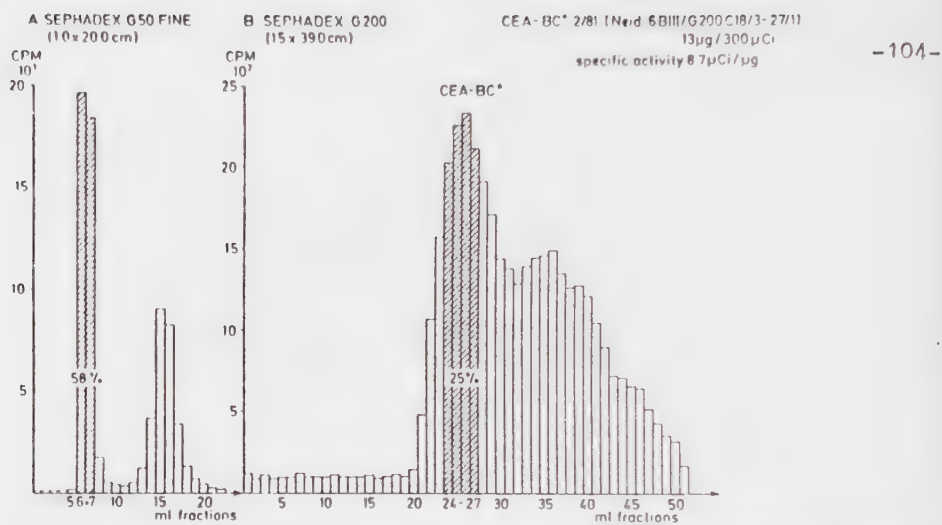


Abb. 27. J-125-Markierung von Lungenkarzinom-CEA (CEA-BC) und Reinigung des Tracer-Gemisches mittels Gelfiltration an Sephadex G50fine (links) und Sephadex G200 (rechts)

CPM = Impulsrate (counts/minute)

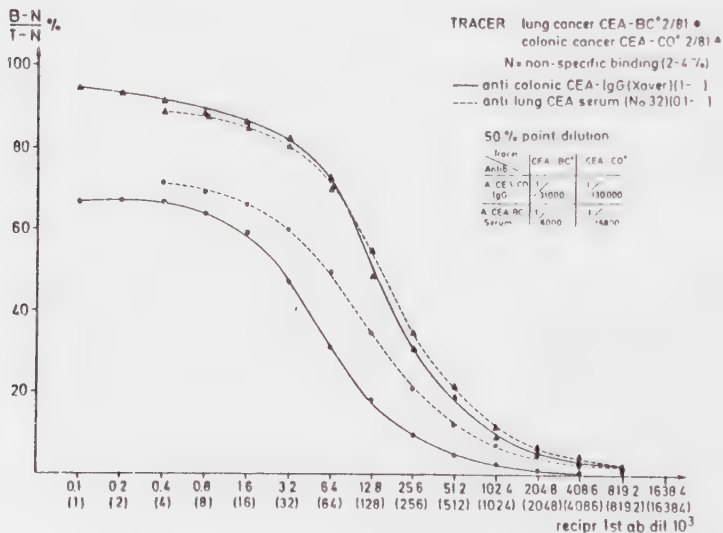


Abb. 28. Antikörper-Verdünnungskurven eines Referenz-Antikolonkarzinom-CEA-Antiserum (Xaver-IgG) im Vergleich zum Lungenkarzinom-CEA-Antiserum (A-CEA-BC Nr. 32) im Ansatz mit den Tracern CEA-Co und CEA-BC

Abbildung 28 zeigt typische Antikörper-Verdünnungskurven mit dem hergestellten Tracer 2/81 (gepoolte Fraktionen von Sephadex G200/24 - 27, mit RIA - Puffer verdünnt auf eine Konzentration von 15. 000 - 20 000 cpm). Wie aus der Abbildung hervorgeht, zeigten die beiden verwandten Antiseren (Referenz-Anti-CEA-IgG "Xaver"; Antiserum Nr. 16/"32") für den Referenz-Tracer CEA-CO 2/81 ein gut vergleichbares Bindungsverhalten mit nahezu parallelen Kurven, aber unterschiedlicher Verdünnung (IgG-Start 1/1000, Antiserum Nr. 16 Start 1/100); ähnlich liegen die Verhältnisse für den Tracer CEA-BC 2/81, wenn auch die Bindungskapazität (maximale Bindung) für beide Antiseren niedriger (65 - 70 %) lag als für den CEA-CO-Tracer (85 - 95 %). Ein Vergleich der 50 %-Punkt-Verdünnung (Verdünnung des Antiserums bei einer Bindung von 50 %) ergibt, daß beim Referenz-Tracer CEA-CO die Verdünnung vom Referenz-Anti-CEA-CO-IgG bei 1/130 000, die vom Anti-CEA-BC-Antiserum bei 1/16 800 lag (Verhältnis 7,7 : 1). Für den Tracer CEA-BC lagen die entsprechenden Werte bei 1/31 000 bzw. 1/6 000 (Verhältnis 5,2 : 1). Auch aus dieser Untersuchung zeigt sich, daß sich beide Antiseren ungeachtet der unterschiedlichen Antikörper-Konzentration im wesentlichen ähnlich verhalten (ähnliche Bindungskapazität und parallele Kurven).

Zur Beurteilung der Austauschbarkeit verschiedener organabhängiger CEA-Antigen- und Antikörper-Präparationen wurden Tracer, 1. Antikörper und CEA-Standards der Lungenkarzinompräparationen im Vergleich zu den Referenz-Colonkarzinom-Präparationen schrittweise gegeneinander vertauscht und in Standard-Inhibitionskurven nach Logit-Log-Auswertung untersucht und miteinander verglichen (Abb. 29/30; Tab. 4/5).

Wie aus Abb. 29 und 30 hervorgeht, verliefen die Standardkurven unter Verwendung von Standard CEA-CO oder CEA-BC praktisch parallel und übereinstimmend; ferner fällt auf, daß unter Verwendung von Tracer CEA-BC die Steigungen der mit den Antiseren A-CEA-Co und A-CEA-BC ermittelten Standardgeraden im Vergleich zu ihrem Verhalten bei Tracer CEA-CO steiler und nahezu identisch

sind, während sie bei Tracer CEA-CO etwas flacher für Antiserum A-CEA-CO und deutlich flacher für Antiserum A-CEA-BC sind. Dieser Augenschein wird durch die Zusammenstellung der Regressions-Gleichungen der Standardgeraden in Tab. 4 und die Signifikanz-Prüfungen der B-Werte (Steigungen) in Tab. 5 gestützt: Für alle Untersuchungen zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den A- und B-Werten bei Austausch der beiden CEA-CO- bzw. CEA-BC-Standards.

Beim Tracer CEA-BC ergibt überdies ein Austausch der beiden Antiseren keine Unterschiede für die A- und B-Werte, während bei Verwendung von Tracer CEA-CO und Antiserum A-CEA-BC deutlich niedrigere A- und B-Werte als bei Verwendung von Antiserum A-CEA-CO erhalten werden; ein Vergleich der A- und B-Werte gleichen Antiserums und Standards, aber unterschiedlichen Tracers ergibt ebenfalls deutlich signifikante Unterschiede, vor allem für die B-Werte. Aus diesen Ergebnissen folgt: Beim Vergleich verschiedener CEA-Antigen- und Antikörper-Präparationen unterschiedlicher Organe als Tracer, Standards und Antiseren zeigt sich der geringste Unterschied bzw. kein Unterschied für unterschiedliche CEA-Standards, ein etwas größerer Unterschied für die Antiserum-Präparation und der größte Unterschied für den Tracer; für diesen letzten größten Unterschied dürfte in erster Linie das Markierungsverfahren verantwortlich sein. Da in einem organ-bezogenen radioimmunologischen CEA-System der Wechsel eines Organ-CEA-Standards, der ja nach den Untersuchungen so gut wie keine Änderungen der Geradenparameter hervorruft, etwa dem Wechsel eines zur CEA-Bestimmung verwandten organ-tumor-unterschiedlichen Patientenserums entspricht, folgt, daß bei Verwendung unterschiedlicher CEA-RIA-Systeme keine signifikanten CEA-Wertunterschiede für Patienten mit unterschiedlichen CEA-bildenden Tumoren zu erwarten sind. Diese Vermutung trifft freilich nur für die hier verwendeten und getesteten polyklonalen Anti-CEA-Seren zu. Die Ergebnisse der durchgeführten CEA-Serumbestimmungen werden unter Punkt 2.4.5.3.3. beschrieben.

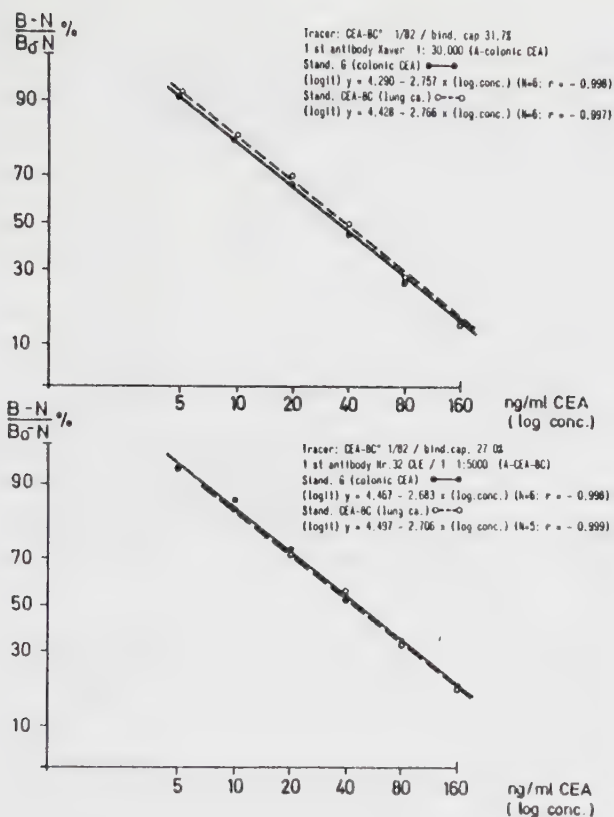


Abb. 29. Standard-Inhibitionskurven bzw. Logit-Log-Geraden von Lungenkarzinom-CEA-Tracer und Referenz-Anti-CEA-CO-Serum (Xaver, oben) bzw. Antilungenkarzinom-CEA-Serum (Nr. 32, unten) unter Verdrängung durch zwei verschiedene CEA-Standards (CEA-CO und CEA-BC)

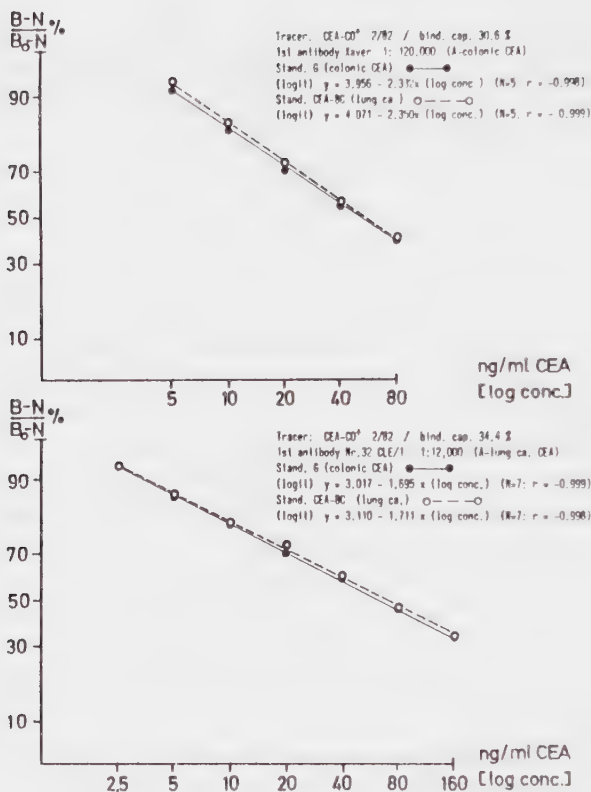


Abb. 30. Standard-Inhibitionskurven bzw. Logit-Log-Geraden von Kolonkarzinom-CEA-Tracer (CEA-CO) und Referenz-Anti-CEA-CO-Serum (Xaver, oben) bzw. Anti-Lungenkarzinom-CEA (Nr. 32, unten) unter Verdrängung durch zwei verschiedene CEA-Standards (CEA-CO, CEA-BC)

Tabelle 4

Parameter der Standard-Inhibitionskurven in Abhängigkeit von verschiedenen Tracern, Antisera und Standards für CEA

Tracer	Antiserum-Konzentration	Standard IHS Inhib.	Unspez. Bindung ($\bar{x} \pm s$)	Bindungs- aktivität ($\bar{x} \pm s$)	50%-P. Y=A+B ng/ml A ($\bar{x} \pm s$) ($\bar{x} \pm s$) ($\bar{x} \pm s$)	$\bar{x}$ B Exp.Hr.
CEA-CC	A-CEA-CC (Xav.)	CEA-CC	3.8±1.2	31.5±4.9.	36.8±10	3.57 2.27
4/75-	1/80 000-				+0.37	+0.23
7/80	1/120 000		N=230	N=230	N=230 N=238	N=238
N=33						
CEA-CC	A-CEA-CC (Xav.)	CEA-CC	4.2	30.6	49.7	3.96 -2.33 1
2/82	1/120 000	CEA-BC	4.2	30.6	54.0	4.07 -2.35 2
	A-CEA-BC (32)	CEA-CC	4.3	34.4	60.2	3.02 -1.70 3
	1/12 000	CEA-BC	4.3	34.4	65.8	3.11 -1.71 4
CEA-BC	A-CEA-CC (Xav.)	CEA-CC	2.7	31.7	36.0	4.29 -2.76 5
2/82	1/30 000	CEA-BC	2.7	31.7	39.9	4.43 -2.77 6
	A-CEA-BC (32)	CEA-CC	2.7	27.0	46.2	4.47 -2.68 7
	1/12 000	CEA-BC	2.7	27.0	45.9	4.50 -2.71 8

Tabelle 5

Signifikanzen der B-Werte (Steigungen) der Standard-Inhibitions-Regressions-Geraden (Logit-log-Auswertung) aus Tabelle 4

Tracer	Exp.-Nr.	1 ⁺	3	5 ⁺	7
CEA-CO	1	/	4	3	1
2/82	2	ns	4	3	1
	3	4	/	4	4
	4	4	ns	4	4
CEA-BC	5	3	4	/	ns
2/82	6	1	4	ns	ns
	7	1	4	ns	/
	8	2	4	ns	ns

Bewertung: ns = nicht signifikant; p: 1 = < 0.02; 2 = < 0.01
3 = < 0.005; 4 = < 0.001;

Obere Zeile: 1⁺; 5⁺: A-CEA-CO (Xaver) + Standard CEA-CO;
3,7: Standard-CEA-CO

2.4.4.4. LCAA-4 (NCA)

Schon in Abb. 24 war bei Untersuchung von Antiserum Nr. 15 ("24") in der Immundiffusion gegen LCEP, LCES und LCEAS aufgefallen, daß dieses Antiserum neben einer etwas kräftigeren Linie (antigen-reservoir-nahe) eine etwas schwächere und flauere Präzipitatslinie (antikörper-reservoir-nahe) gegen diese Extrakte bildete, die nach Abb. 31 mehr in den niedermolekularen Fraktionen (wie hier am Beispiel von LCEAS, Fr. G200/II und /III) zu finden war entsprechend einem Molekulargewichtsbereich von unter 10^5 . Dieses Antigen konnte in der Untersuchung im Vergleich mit einem Referenz-Anti-NCA-Serum durch eine identische immunologische Reaktion als NCA identifiziert werden. Abbildung 32 zeigt die Verbreitung von NCA in verschiedenen Perchlorsäure-Extrakten bzw. -Fraktionen mittels eines hochspezifischen Referenz-Anti-NCA-Serum (Nr. 43), das durch zusätzliche Absorption gegen gereinigtes CEA die mit ihm kreuzreagierenden Antikörpern verloren hat. Wie aus der Abbildung hervorgeht, war NCA nicht nur in LCEP II und einem Perchlorsäure-Extrakt von normaler Lunge (LE), sondern auch in anderen Perchlorsäure-Extrakten von z. B. einem Ascites von einem Patienten mit Colonkarzinom (Meissn. PCA) und auch in den niedermolekularen Fraktionen des Pleuraexsudat-Extraktes des Patienten mit Lungenkarzinom (Heid. 6BIII G200/II und 6BIV) vorhanden. Dieses NCA konnte durch Immunadsorption an einer CNBr-aktiv. Sepharose 4B-Säule mit angekoppelten kreuzreagierenden Anti-CEA/NCA-Antikörpern (CNCA/3) weiter angereichert und durch Immunadsorption an einer analogen Säule mit angekoppeltem Anti-Humanserum IgG (G27/1a) rein dargestellt werden (Abb. 33). Wegen des weitverbreiteten Vorkommens von NCA auch in den normalen Lungengeweben (LE, NLE, LCEH) wurde es jedoch nicht für den Aufbau eines Radioimmunoassays verwandt.

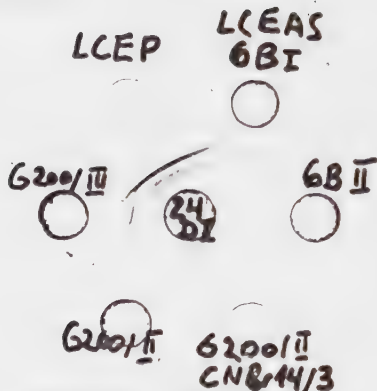


Abb. 31. Immundiffusionsuntersuchung von Antiserum Nr. 15 ("24", DEAE-Zellulose-Chromatographie-Fraktion I) im Ansatz gegen LCEP und verschiedene Gelfiltrationsfraktionen von LCEAS

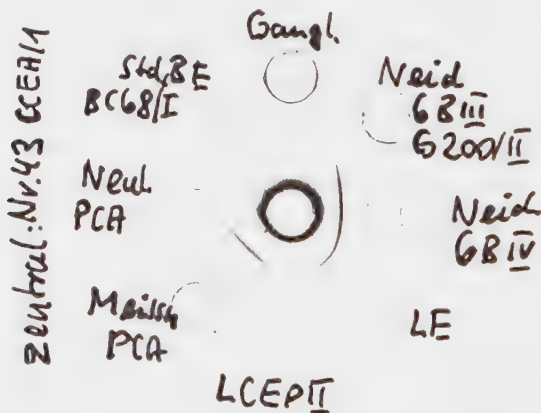


Abb. 32. Immundiffusionsuntersuchung von einem spezifischen Referenz-Anti-NCA-Serum (Nr. 43 CCEA/1, zentral) im Ansatz gegen gelfiltrierte Perchlorsäure-Extrakte aus Pleuraexsudat von Tumorpatienten (Neid., Neul., Meissn.) sowie gegen normalen Lungengewebeextrakt LE und Lungenkarzinomextrakt LCEP/II

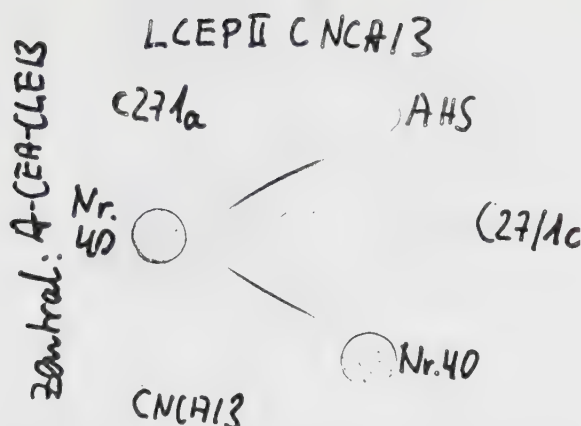


Abb. 33. Immunodiffusionsuntersuchung von zwei hochgereinigten CEA-Präparationen aus LCEP/II (CNCA/3 bzw. C27/1a) im Ansatz gegen ein unspezifisches mit NCA kreuzreagierendes Referenz-Anti-CEA-Serum (A-CEA-CLE/3 -adsorbiert, zentral) und gegen zwei Referenz-Antiseren gegen normale Serumproteine (AHS) und gegen α_1 -Serumproteine (Nr. 40)

2.4.4.5. LCAA-5

Ein bisher nicht identifiziertes Antigen konnte in der Immuno-diffusion mit einem Referenz-Antiserum gegen den Perchlorsäure-Extrakt von normaler Colonschleimhaut (Anti-NE "Max") als ein niedermolekulares Antigen nachgewiesen werden, daß zunächst irrtümlicherweise als NCA fehlgedeutet wurde, aber später durch Prüfung mit dem hochspezifischen Referenz-Anti-NCA-Antiserum Nr. 43 als NCA ausgeschlossen werden konnte. Abb. Nr. 34 weist dieses unbekannte Antigen in den LCEP-Fractionen G200/II, III und G100/I und II, nicht jedoch in höhermolekularen Gelfiltrationsfraktionen nach. Ebenso läßt sich dieses Antigen in den LCEP-Fractionen G200/III und G200/IV nachweisen und durch Immunadsorption auf einer CNBr-aktiv Sapharose 4B-Säule mit angekoppeltem Anti-NE-IgG (CNE) anreichern und über eine C27-Säule weiter reinigen (Abb. 35). Auch dieses Antigen wurde wegen seines verbreiteten Vorkommens in normalen Lungenextrakten nicht für einen Radioimmunoassay verwandt.

Abb. 36 bringt einen Vergleich von Anti-NE-Serum mit Antiserum Nr. 15 ("24") und seinen absorbierten bzw. bindenden Unterfraktionen im Ansatz gegen LCEP/I. Danach konnten mit Antiserum Nr. 15 ("24") mindestens 2 Antigene in LCEP/I nachgewiesen werden (Abb. 36 oben), von denen eines auch von der an normalen Lungengewebeextrakt (CLE/3) und CEA (CCEA/3) bindenden Antikörperfraktionen erkannt wurde und mit Anti-NCA-Serum (Nr. 46) eine immunologische Identitätsreaktion aufwies, das Antigen also als NCA identifizierte. Diese Präzipitatslinie wird von einer ähnlichen Linie von Anti-NE-Serum gekreuzt, die dieses gegen LCEP/I bildet. Eine dritte Präzipitatslinie von Anti-NE-Serum läuft mit nicht absorbiertem Antiserum Nr. 15 ("24") zusammen und ist gegen ein von beiden Antiseren erkanntes Antigen gerichtet. Daneben zeigt die Reaktion von einer an normales Lungengewebeextrakt, aber nicht an CEA bindenden

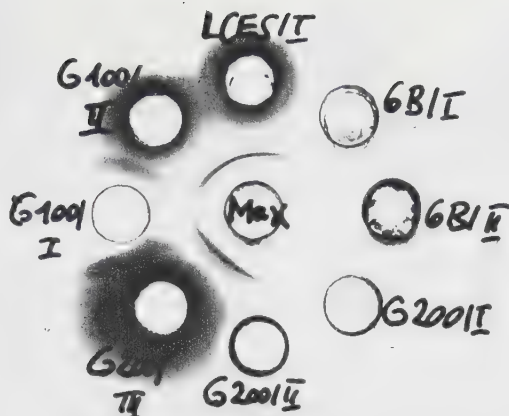


Abb. 34. Immunodiffusionsuntersuchung von verschiedenen Unterfraktionen von LCES gegen ein Referenz-Antiserum gegen normalen Colonschleimhaut-extrakt (Max, A-NE, zentral)

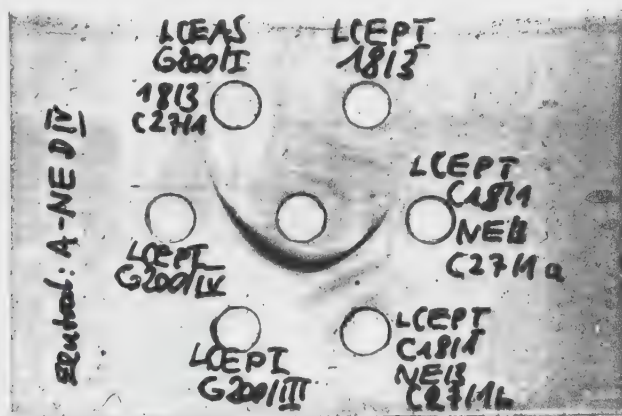


Abb. 35. Immunodiffusionsuntersuchung von verschiedenen Gelfiltrations- und Immunabsorptionsfraktionen von LCEP und LCEAS im Ansatz gegen ein Antiserum gegen normalen Colonschleimhautextrakt (A-NE D IV)

Nr. 24 DI

Nr. 24
CLEI3
CCEA/3

-116-

Zentral: LCEPI

A-NE
DIIINr. 24
CLEI3
CCEA/1Nr. 46
A-NCA

NCA+

LE
S200/II

Nr. 32 DI

Abb. 36. Immunodiffusionsuntersuchung von Antiserum Nr. 15 ("24" DI) und zweier an normalen Lungengewebeextrakt bindenden (CLE/3), aber an CEA unterschiedlich bindenden (nicht: CCEA/1, bindend: CCEA/3) Fraktionen im Vergleich mit einem Referenz-Anti-NCA-Serum (Nr. 46), Anti-CEA-Serum (Nr. 32 DI) und Antiserum gegen normalen Colonschleimhautextrakt (A-NE/D III) und im Ansatz gegen LCEP/I, normalen Lungengewebeextrakt (LE-Fraktion S200/II) und eine NCA-positive Kontroll

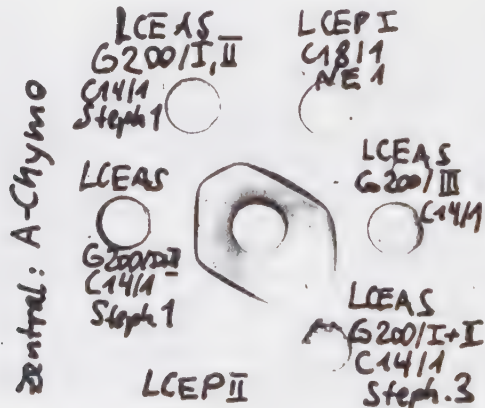


Abb. 37. Immunodiffusionsuntersuchung von LCEP/II und verschiedenen gelfiltrierten und immunabsorbierten Unterfraktionen von LCEP/I und LCEAS im Ansatz gegen ein Referenz-Anti- α_1 -Chymotrypsin (A-Chymo, zentral)

Unterfraktion von Antiserum Nr. 15 (24 CLE/3-CCEA/1, Abb. 36 links), daß in LCEP/I mindestens 4 unterschiedliche Antigene erkannt werden.

2.4.4.6. Andere Antigene

Als bekanntes Antigen konnte mittels Immunodiffusion in allen Lungentumor- und Normalgewebsextrakten α_1 -Chymotrypsin nachgewiesen werden. Abbildung Nr. 37 zeigt eine typische Immunodiffusions-Untersuchung für LCEP (I + II) und Unterfraktionen von LCEAS.

Tabelle 6 gibt eine zusammenfassende Übersicht über die gefundenen Antigene und die entsprechenden Antiseren.

Tabelle 6

Übersicht über die entdeckten Antigene und korrespondierenden Antikörper

Extr./Frakt.	ICAA-1 (Ferr.)	ICAA-2 (Laktof.)	ICAA-3 (CEA)	ICAA-4 (HCA)	ICAA-5 (?)
ICES					
6B/II	+	+	-	-	-
G200/I	+	+	(+)	-	-
G14/3-27/1	+++	(+)	-	-	-
G14/1-27/1	(+)	++	-	-	-
G200/II	-	-	-	(+)	+
G200/III	-	-	-	(+)	+
ICFAS					
6B/II	+	+	-	-	-
G200/I	+	+	(+)	-	-
G14/3-27/1	+++	(+)	-	-	-
G14/1-27/1	(+)	+++	-	-	-
G200/II	+	+	-	(+)	+
G200/III	++	-	-	(+)	+
ICFP					
G200/I	-	-	++	-	-
G200/II	-	-	+	(+)	-

Fortsetzung Tabelle 6

Str./Frakt.	LCAA-1	LCAA-2	LCAA-3	LCAA-4	LCAA-5
EP					
G200/III	-	-	-	++	+++
G200/IV	-	-	-	++	++
CHCA/3	-	-	-	+++	-
CNE/3	-	-	-	-	-
eid.PCA					
6B/III	-	-	+++	-	-
C18/3-27/1	-	-	+++	-	-
6B/IV	-	-	(+)	+++	-
LE	(+)	(+)	-	(+)	(+)
CEU	(+)	(+)	-	(+)	(+)
ntisieren					
Nr.2-6,12-14	++	+/(+)	-	-	-
Nr.15("24")	-	-	(+)	++	-
A-NE (Max)	-	-	-	-	+++
Nr.16("32")	-	-	+++	n.a. + LEa. -	-

Tabelle 7

Zusammenstellung der wichtigsten Patientendaten, histologischen, klinischen und Behandlungsdaten und Serumkonzentrationen von AFP, CEA und Ferritin der untersuchten Patienten mit malignen und benignen Lungenerkrankungen.

Gesamtzahl der Patienten 190, davon 165 mit Bronchialkarzinom (BK), weitere 25 Patienten mit benignen Lungenerkrankungen als Vergleichskollektiv (VK).

Anzahl der Patienten im Stadium I:11, im Stadium II 37, im Stadium III:19 und im Stadium IV:98

Bei einigen Lungenkarzinomen können keine Angaben über die Histologie gemacht werden, weil in den erreichbaren Krankengeschichten, vor allem bei weit fortgeschrittenen Bronchialkarzinomen, Hinweise hierzu fehlten.

Die Serumwerte wurden, so weit wie möglich kurz vor, sieben und vierzehn Tage nach der Operation bestimmt, bei einigen Patienten konnte auch ein Verlauf (V) über Monate dargestellt werden.

Abkürzungen:

BK	:	Bronchialkarzinom
Tb	:	Tuberkulose
li/re	:	links/rechts
O/U/M-L	:	Ober/Unter/Mittel-Lappen
Ex	:	Entfernung
OP	:	Operation
inop	:	inoperabel
rez	:	Rezidiv
PE	:	Plattenepithel
Tt	:	Thorakotomie
Res	:	Resektion
Relaxdia	:	Relaxation des Diaphragma
Mukoepi	:	Mukoepitheliales Karzinom
VK	:	Vergleichskollektiv (benigne Lungenerkrankungen)

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	APP	CEA	Per	Histologie	Stadium	Therapie (Op.
Art.B.	13.09.18	61	männl.	23.08.79	2,4	2	-	BK	IV (rez)	-
				14.11.79	-3	2	-			Op 78
Bäd.J.	20.07.12	64	männl.	17.05.76	12	-	-	-	-	-
				24.08.76	3	7	1238	BK, vorh. TB	III	-
Bel.U.	15.09.43	36	männl.	04.04.79	6	2,6	-	Bronchiektasen	VK	Li UL Ex
Bar.P.	07.12.20	58	männl.	24.07.78	4	-2	350	BK	I	Op.
Bau.P.	01.03.20	59	männl.	19.09.79	2	5,6	-	BK	III	-
Bau.A.	08.10.20	57	männl.	28.11.77	2	4,7	219	BK	IV	inop.
				22.12.77	2	3,6	196	-		
Bay.P.	02.01.56	22	männl.	19.10.78	6	-2	-	Hämangio-	VK	Op.
				07.02.79	-	-2	-	pericytom		
Ber.W.	07.05.16	61	männl.	05.10.77	4	4	1562	BK, klein-	IV	-
				11.10.77	4	7	1575	zellig		
				12.10.77	4	5	-			

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	APP	OMA	Per	Histologie	Stadium	Therapie (Op.)
Ber.G.	18.08.19	58	männl.	31.08.77	7	320	207	BK Tb	IV	-
Ber.E.	20.06.18	60	weibl.	01.12.78	-	2,3	-	BK Adeno	III (rez)	UL RDS
				19.12.78	2	2,7	202			
				18.06.79	-2	3,3				
				20.09.79	-2	3,7				
Ber.F.	04.10.06	71	männl.	02.06.77	4	360	693	BK	IV	-
Bic.K.	21.05.42	36	weibl.	12.06.78	3,0	9,5	872	BK	IV	-
Bic.N.	09.10.35	43	männl.	05.06.78	5	-2	902	BK	II	-
Bla.A.	13.02.28	51	männl.	04.06.79	8	4	-	BK	IV	-
				20.06.79	7	5,3	-			
Bla.H.	20.02.31	47	weibl.	26.01.78	-2	211	118	BK, PE	IV	Probe-Pl
Bot.J.	23.08.23	53	weibl.	22.03.76	-2	3,5	-	BK	IV	-
Bra.L.	13.09.15	53	männl.	22.05.78	3	-2	3163	BK, PE	IV	16.05.78 Probe-Pl

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	APP	CEA	Per	Histologie	Stadium	Therapie(Op
Cer.V.	15.09.19	58	männl.	-	5	-2	-	Relaxdie	VK	
Chr.K.	01.09.12	65	männl.	27.12.77	6	4,2	179	Lungencyste	VI	
Dax. J.	17.09.46	32	männl.	-	5	4	-	TB, Alko	VK	
Dan.G.	29.08.10	69	männl.	Prä Post	3 2	10 19	-	BK, Pe	III	Op. 09.07.79 + 28.07.79
Die.E.	08.12.03	74	männl.	02.12.77	4	-2	202	BK, Pe	II	Op. verw.
Drn.A.	01.02.12	66	männl.	12.06.78	7	3,2	915	BK	IV	+ Juli 78
Dud.F.	18.08.27	50	männl.	05.04.77	4	3,1	-	BK	II	
Dun.F.	18.10.15	64	männl.	03.04.79	2	37	-	BK, Pe	IV	inop.
Ebe.T.	10.04.13	65	weibl.	-	7	-2	-	TB	VK	
Ech.K.	06.11.17	59	männl.	12.01.76	2	-2	505	BK	II	

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	ATP	OMA	Per	Histologie	Stadium	Therapie (Op.)
Eck.E.	28.05.20	56	männl.	11.05.76	3	-2	1112	BK	III	
Eck.J.	21.01.10	66	männl.	06.07.76 12.10.76	2 -	9 5,5	991	BK	II	Op.
Eck.J.	31.10.04	75	männl.	06.02.79	12	27	-	BK, Pe	IV	-
Egg.K.	23.08.04	72	männl.	23.09.76	3	88,7	1379	BK	IV	-
v.Eic.I.	16.03.24	55	weibl.	07.06.79	6	-2	-	BK	IV	Op. 76
Eim.J.	16.05.26	46	weibl.	-	7	7	-	Abcess	VK	
Ers.K.	22.04.06	69	weibl.	28.11.75	-2	12,4	635	BK	IV	Strahlen
Fär.E.	23.03.26	50	männl.	12.07.76	3	6,8	457	BK	IV	
Fed.G.	15.07.09	69	männl.	11.12.73	-2	23	562	BK	IV	-
Fel.L.	17.08.90	88	männl.	17.07.78	3	4,4	1138	BK	IV	-

Name	Geurt	Alter	Geschlecht	Datum	ATP	CEA	Per	Histologie	Stadium	Therapie(Op.)
Fin.A.	12.12.02	74	männl.	11.05.76	2	18	261	BK	IV	
Fis.H.	05.09.19	59	männl.	28.03.78	-2	-2	535	BK	IV	
Fle.W.	15.11.11	68	männl.	17.09.79	3	2,9	-	BK	IV	
Für.K.	26.03.30	59	männl.	15.06.79	4	3,5	-	BK, Mukoepl	IV	
Geb.A.	03.01.15	64	weibl.	23.08.79	-2	5,6	-	BK, Pe	III	Op. 09.08.79
				31.08.79	2	4,2	-			
Ger.L.	28.11.08	70	männl.	08.02.78	2	5,9	1144	BK, Pe	II	Op.
				08.05.78	3	4	662			
Ger.H.	29.03.15	64	männl.	30.03.79	4	17	-	BK, Mukoepl	IV	Op. 23.03.79
					6	23				
v.Gi.J.	10.10.16	62	weibl.	17.11.78	6	-2	259	BK	II	-

Name Geburts Alter Geschlecht Datum WFP GMA Den Histologie Stadium Therapie (Op.)

Göd.C.	26.01.04	70	männl.	29.03.74	3	8,2	1524	BK, Pe	III	-
Göt.W.	08.10.12	66	weibl.	10.05.78	14	-2	292		VK	Op. 18.05.78
Gör.H.	21.10.21	57	männl.	22.05.78	5	3	838	BK, Pe	II	-
				01.06.78	4	-2	1301			
Gru.N.	09.06.06	70	männl.	31.05.76	4	21	898	BK	IV	-
Gru.P.	03.04.12	65	männl.	14.09.77	4	-2	309	BK, klein	IV	Strahlen
				13.10.77	6	4	281	zellig		
				30.11.77	4	3,1	363			
				21.02.78	-	9,8	-			
				13.03.78	-	12	-			
Gyr.F.	24.09.10	68	weibl.	10.05.79	4	16	599	BK; anaplast.	II	
Hag.A.	27.11.10	68	männl.	02.11.73	4	-2	12		VK	
Han.H.	27.03.09	70	männl.	20.02.73	2	15	-	BK, Pe	IV	Op. 28.02.79
					6	8				

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	App	CEA	Per	Histologie	Stadium	Therapie (Op.)
Het.M.	22.03.04	75	männl.	28.03.79	-2	-2	374	BK, Fe	II	Op.
				11.04.79	3	-2	1704			
Han.W.	26.11.98	80	männl.	30.10.79	4	-2	-	BK	II	Strahlen
				12.01.79	4	-2	-			
Han.K.	01.10.10	69	männl.	15.01.79	5	34	-	BK, Pe	IV	
Hec.R.	27.03.32	46	männl.	23.10.78	7	62	616	BK	III	-
Hef.S.	24.12.02	75	männl.	08.06.77	2	439	6085	BK, Pe	IV	+ 11.06.77
Hef.S.	11.10.52	52	männl.	20.09.79	3,6	20	-	BK, klein-	IV	Zytostase
				21.09.79	3	18		zellig		
Hel.G.	23.08.31	47	männl.	15.09.78	4	28	580	BK, Adeno	III	
Hen.P.	08.10.09	70	männl.	17.07.79	6	126	-	BK	IV	
Hon.P.	23.01.23	56	männl.	Pre.	4	3,4	-	BK, Pe	II	
				Post	3	-2	-			
				13.07.79	3	-2				Op. 29.06.79

Name	Securt	Alter	Geschlecht	Datum	APP	USA	Per	Histologie	Sodium	Therapie (Op.)
Hör.M.	17.05.28	51	männl.	Prä. 14.03.79 Post.14.	5 6 9	-2 -2 -2	-	Abszeß	VK	Op. 20.03.79
Hof.R.	26.04.59	20	weibl.	-	5	-2	158	73	VK	
Hof.R.	09.11.06	72	männl.	16.03.78	6	125	550	BK	IV	
Hol.L.	04.04.07	69	männl.	25.11.76 23.12.76	3	18,3 57	2716	BK	IV	
Hun.P.	20.12.11.	67	männl.	08.02.78 27.02.78 03.03.78	-2 -2 3	-2 -2 -2	211 673 471	BK, Pe	II	im ex 20.02.78
Jäg.J.	16.09.21	58	männl.	18.10.79	6	11	-	BK, klein zellig	IV	
Jun.T.	02.05.22	57	weibl.	02.04.79	5	-2		Benigne	VK	Op. 06.04.79
Käs.M.	02.02.14	65	männl.	16.05.79	103	8	-	BK	IV	Strahlen

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	APP	CTA	Per	Histologie	Stadium	Therapie (Op.)
Kal.M.	27.06.08	70	männl.	02.06.78	3	13	1078	BK	IV	
Kar.W.	11.10.40	39	männl.	19.04.79	7	3,9	-	BK, Pe	IV	+ 18.05.79
Ken.R.	26.12.04	73	weibl.	15.12.77	5	3,3	434	BK	II	kein Op.
Kie.T.	29.05.28	51	männl.	Prä. 7.Post. 14.Post.	4 6 6	-2 -2 -2	-	BK, klein- zellig	II	Op. 19.03.79
Kir.G.	04.07.37	42	männl.	25.10.79	3	8	-	BK	III	
Kla.G.	07.09.17	62	männl.	17.04.79	5	5,5	-	BK	IV	
Kol.A.	05.12.07	71	männl.	06.12.78	5	5,2	-	BK, klein- zellig	IV	
Kol.F.	27.07.13	66	männl.	13.06.79	5	3,4	-	Bronchi- ektasen	VK	
Kon.J.	19.05.09	69	männl.	09.11.78	4	-2	320	BK	IV	

Kop.J.	08.01.30	49	männl.	11.01.79	8	-2	261	Pneumonie	VK	
Kov.V.	03.10.13	61	männl.	25.07.79	-2	37	-	BK	IV	
Kra.H.	20.12.19	60	männl.	05.04.79	-2	4	-	BK	II	
Kre.L.	15.08.19	59	männl.	28.09.76 03.04.78	2 2	2	809	BK	IV(rez)	Strahlen
Kuc.F.	02.08.22	56	männl.	09.01.78	6	4,1	151	BK, Pe	I	Kein Op.
Kur.R.	08.01.21	57	männl.	22.05.78 14.06.78 08.03.79	3 3 5	40 671 129	889 3186 -	BK	IV	
Lan.F.	28.02.59	20	männl.	08.03.79	11	-2	-	TB, Lues	VK	
Lan.M.	26.08.06	72	männl.	01.02.78	6	5783	1188	BK	IV	
Lec.B.	15.06.04	74	weibl.	28.04.78 16.08.78 03.10.73	7 9,2 8	14 27 39	- 748 429	BK, Adeno	IV	

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	ATP	CEA	Per	Histologie	Stadium	Therapie (Op.)
Loh. J.	19.06.21	57	männl.	16.10.76	4	-2	2661	BK	IV	
Loh. J.	06.10.23	54	männl.	22.06.77	-	7,7	-	BK, klein-	IV	Strahlen
				26.09.77	-	27	-	zellig		
				29.05.77	3	32	5534			
Loh. E.	20.12.25	52	männl.	11.05.77	-2	7	1254	BK-Pancoast	IV	Strahlen
				27.05.77	-	11	-			
				02.06.77	-	13	-			
Loh. G.	12.02.54	24	weibl.	10.02.78	2	-2	103	Neurinom	VK	Op.
Loh. B.	19.04.14	65	männl.	02.05.79	4	3,4	-	BK	IV	Op. 73
Loh. H.	04.02.29	50	männl.	10.04.79	6	-2	-	BK	IV	Strahlen
Loh. A.	09.01.27	51	männl.	19.12.78	3	-2	772	BK, Pe	II	
Loh. A.	09.11.21	50	weibl.	12.03.79	4	2	-	BK, Adeno	I	IL ex 16.03.79
				7. Post	5	3,3	-			
				30.03.79	3	-2				

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	APV	UZA	Per	Micrologie	Stadium	Therapie (Op.)
Kai.G.	26.03.21	58	männl.	22.08.79	-2	139	-	BK	IV	Strahlen
Kai.P.		51	weibl.	27.04.79	5	6	-	BK, Pe	IV (rez)	
Kai.A.	15.04.06	72	männl.	09.01.78	3	-2	173	BK, groß	IV	im ex 16.01.73
				23.01.78	3	-2	229			
				30.01.78	4	-	-			
Kai.W.	13.09.15	63	männl.	09.10.78	9	-2	513	BK, Lues	IV	
Kar.N.	15.12.35	44	männl.	25.04.79	6	-2	-	TS	VK	
Kay.P.	01.04.05	72	männl.	01.03.77	3	7	1086	BK	IV	Strahlen
Kef.A.	08.03.21	55	männl.	29.06.76	3	-2	1471	BK	II	
Mei.J.	12.04.04	74	männl.	11.01.78	3	2,1	691	BK, Pe	II	Op. 13.01.73
				7.Post	5	-2	101			
				14.Post	5	5	-			
Kel.H.	02.10.11	67	männl.	07.02.78	-2	2,1	173	BK	II	
				27.02.78	4	3	818			
				06.03.78	6	-2	903			

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	AFP	CTA	Fer	Histologie	Stadium	Therapie (Op.)
Mes. J.	12.12.22	57	weibl.	28.08.79	4	629	-	BK	IV	Strahlen
Mes. J.	04.02.13	75	weibl.	-	6	-2	-	Lungencyste	VK	
Mes. M.	25.05.11	67	weibl.	03.05.78	5	64	717	BK, Adeno	IV	Strahlen
Met. D.	13.03.13	65	männl.	10.05.78	3	-2	914	BK	II	
				30.05.78	3	-2	1247			
Mes. M.	18.10.23	46	männl.	10.01.79	9	4,9	-	BK	IV	
Mes. L.	29.06.08	70	weibl.	11.07.78	4	7,7	481	BK, Pe	IV	
				15.07.78	3	5,7	907			
Mes. K.	21.02.07	71	männl.	30.01.78	2	-2	165	BK, Pe	II	Op. 25.04.78
Mes. J.	30.01.07	71	männl.	29.08.78	6	7,3	389	BK, kleinzellig	IV	
Mes. J.	05.12.04	73	männl.	14.02.77	6	45	1157	BK	IV	Zytostase
				21.07.77						

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	ATP	ODA	Per	Histologie	Stadium	Therapie (P.P.)
Mih.G.	16.03.36	41	männl.	05.09.77	2	17	567	BK, anaplast	IV	Zytostase
Mil.A.	25.09.12	65	weibl.	28.06.77	-	9,2	-	BK	IV(rez)	
				20.07.77	3	10	-	BK	IV	
Mil.J.	24.07.28	49	männl.	03.03.77	5	8,9	2245	BK, klein zellig	IV	
Mil.S.	03.10.98	80	männl.	14.03.78	3	4,8	605	BK	IV	
Nag.E.	29.08.22	57	weibl.	25.04.79	5	8	-	BK, großz.	IV	
Nun.R.	07.05.25	54	männl.	11.01.79	5	5,8	502	BK, Pe	IV	inoperabel
Ötv.R.	20.04.20	59	weibl.	28.08.79	3	95	-	BK	IV	inoperabel
Ost.J.	12.04.07	71	männl.	22.05.78	7	13	128	BK, Adeno	IV	Strahlen, ZS
Osw.M.	03.11.03	66	weibl.	-	5	-2	-	Pneumonie	VII	+ 24.05.79
Par.P.	18.12.41	38	männl.	24.04.79	3	4,1	-	milliar-TB	VII	

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	ATP	ODA	Per	Histologie	Stadium	Therapie (Op.)
Paw.H.	21.11.22	56	männl.	12.01.78	-2	-2	133	Hämangom	VK	
Per.E.	19.01.12	66	männl.	27.01.78	3	-2	540	BK	IV	inoperabel
				14.02.78	4	-2	1054			
Pet.F.	27.11.17	61	männl.	22.06.78	2	-2	1899	BK, klein zellig	IV	
Ple.K.	20.07.14	65	männl.	14.03.79	6	6	-	BK	III	
Plo.L.	23.08.07	68	männl.	12.12.75	3	5	536	BK	II	
Por.L.	08.07.17	59	männl.	18.02.76	5	2,1	1496	BK	II	
Pra.P.	17.05.06	73	weibl.	16.05.79	4	-2	-	BK, Adeno	II	Op. 25.05.79
				7.Post	3	-2	-			
				14.Post	3	-2				
Pre.A.	23.01.19	57	männl.	02.06.76	4	3	307	BK	II	
Prz.F.	05.08.00	76	männl.	02.06.76	3	-2	152	BK	IV	

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	MF	OMA	Per	Histologie	Stadium	Therapie
Rak.J.	10.12.20	56	männl.	06.07.76	-2	10	679	BK	IV	
Rah.H.	10.10.99	78	männl.	16.06.77				BK, Fe	IV (rez)	Op 70
				24.06.77	2	-2	1482			+ 27.08.77
Rei.S.	30.12.30	40	weibl.	24.05.79	3,1	12	-	BK, klein zellig	IV	
Res.I.	12.11.05	74	männl.	Prä	11	4	-	BK, Fe	IV	23.03.79 Probe tt
				30.03.79	6	4	-			+ 03.04.79
Rit.G.	09.04.12	65	männl.	29.12.77	5	122	521	BK	IV	
Rob.A.	23.09.12	65	männl.	29.11.77	2	2,7		BK, klein-	II	
				15.12.77	3	4,7	782	zellig		Op. 07.12.77
				22.12.77	3	3,8	567			
Röl.J.	16.04.09	69	männl.	12.01.78	3	-2	671	Ga	I	Op. 18.01.78
				26.01.78	3	2,7	368			
				30.02.78	2	5,3	159			
				11.07.78	4	6,9	216			
				06.09.78	8	13	280			

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	APP	CTA	Per	Histologie	Stadium	Therapie (Op.)
Rot.H.	12.07.14	64	männl.	-	4	-2	-	BK, Pe	III	inoperabel
Rud.H.	20.08.07	71	männl.	20.07.78	6	-2	183	BK, TB	I	
Sau.W.	27.06.01	77	männl.	24.08.78	3,5	4,6	244	BK, Pe + TB	IV	
				12.09.78	3	5,6	462			
Sep.H.	31.12.15	64	männl.	Prä.	9	5	-	BK, Pe	II	Op. 22.02.79
				06.02.79	8	4	-			
				14.Post	8	-2	-			
Sei.R.	15.07.02	76	weibl.	10.02.78	5	-2	440	BK	III	
Sei.G.	17.07.24	53	weibl.	27.04.77	3	-2	210	BK	II	
Sen.A.	09.02.21	58	männl.	12.04.79	4	4	-	Schwarte	VK	19.04.79 Probe
				30.04.79	4	-2				mt
Sol.A.	02.02.14	65	männl.	08.05.79	6	-2	-	BK, Adeno	IV	Op. 78
Sus.R.	05.02.20	50	männl.	11.04.78	3	-2	773	BK (rez)	IV	
				06.11.70	5	2	-			

Name	Geburt	Alter	Beschlecht	Datum	APP	CTA	Ref	Histologie	Stadium	Therapie (Op.)
Sch.B.	14.09.22	56	männl.	20.7. 7. Post	5 4	-2 -2	-	BK, Klein- zellig	I	Op. 11.06.73
Sch.A.	02.11.06	71	weibl.	10.02.77	4	-2	213	BK, Fe	IV	Strahlen
Sch.B.	23.09.11	67	weibl.	-	4	4	-	BK, Fe	II	Res-Op
Sch.W.	13.10.19	61	männl.	13.06.79	5	-2	-	Schwarte	III	Dekontamination
Sch.A.	21.03.06	63	männl.	18.05.76	2	2	354	BK	IV	Strahlen
Sch.B.	24.09.14	64	männl.	20.07.79	3	-2	1120	BK, Pancoast	III	
Sch.T.	19.08.33	46	weibl.	23.04.79	3	48	-	BK, Klein- zellig	II	Protop 23.04. + 13.09.79
Sch.R.	12.10.28	51	männl.	07.08.79	2,7	2,5	-	BK, Klein- zellig	IV	-
Sch.C.	29.11.14	62	männl.	21.07.73	7	3	15	BK	IV	Strahlen
Sch.B.	17.05.12	66	weibl.	26.05.73 08.06.78 14.06.79	4 4 4	-2 -2 -2	317 272 156	BK, Adeno	II	Op.
Sch.B.	08.12.22	56	männl.	22.05.79 21.05.78	3 3	2,1 3,1	363 1251	BK	III	
Sch.W.	13.05.12	66	männl.	07.03.73	2	44	527	BK, Ad	III	

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	AFP	CEA	Per	Histologie	Stadium	Therapie(Op.
Schw.R.	03.02.04	73	männl.	29.12.77 02.02.78	- 8	-2 -2	- 687	BK	IV	.
St.J.	30.01.29	50	männl.	06.04.78 11.07.79	-2 3	2 4,9	153	BK	IV	Op. 78
St.W.	24.12.10	68	männl.	14.03.78 08.04.78	3 -2	-2	1235 1530	BK, Pe	IV	inoperabel
St.O.	08.05.27	51	männl.	23.02.78 24.05.78	13 3	-2 3,8	879 1308	BK, klein zellig	IV	inoperabel
St.J.	06.03.22	56	männl.	11.01.78 26.01.78 30.01.78 16.06.78	3 -2 2 3	4,9 -3 2,5 2,9	189 221 222 177	-BK, Pe	I	Op. 18.01.78
Ste.A.	15.01.31	46	männl.	26.10.78	5	2511	336	BK (rez.)	IV	Op. 77
Sti.A.	18.02.12	65	männl.	25.11.77 09.12.77 14.12.77	3 5 4	4,8 2,3 -2	448 765 782	BK, Pe	I	Op. 01.12.77

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	A.P.	OTK	Per	Histologie	Stadium	Therapie (Op.)
Sto. S.	23.02.24	44	männl.	03.05.78	3	-2	741	BK, Adeno	I	
				22.05.78	4	-2	400			
Sto. A.	25.09.36	43	männl.	01.03.79	7	-2	-	BK, Klein- zellig	II	Op. 03.03.79
				02.03.79	5	-2				
Str. W.	14.03.23	50	weibl.	13.01.73	5	6,6	89	BK, Adeno	II	Op. 05.01.79
				26.01.78	-2					
Tau. H.	29.04.09	68	weibl.	30.12.77	6	72	647	BK, Adeno	II	Op. 05.01.79
				13.01.78	5	21	298			
				22.01.78	5	25	1030			
				13.06.78	7	22	304			
Tho. H.	14.05.19	59	männl.	21.02.79	5	0	1134	BK, Ep	I	Op.
Tho. T.	10.00.03	50	weibl.	10.03.78	3	4	694	BK	II	
Tho. W.	22.01.03	53	männl.	01.05.70	6	01	6774	BK	IV	Strahlen
Val. U.	21.03.25	54	männl.	12.02.70	6	-2	-	Bronchi- ektasen	III	

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	AFP	CTA	Per	Histologie	Stadium	Therapie(Op)
Vie.J.	26.08.24	54	männl.	-	8	5,5	-	BK, Pa	IV(rez.)	Op. 74
Wbl.J.	25.07.10	66	männl.	01.12.76	3	96	2001	BK	IV	
Vog.K.	20.03.21	56	männl.	21.10.77	4	35	391	BK	IV	inoperabel
Voi.H.	18.11.02	75	männl.	28.02.77	-2	6	-	BK	III	
Vol.G.	08.01.20	58	männl.	28.11.78	6	-2	587	BK	III	
Wal.E.	21.01.06	72	weibl.	21.05.79	4	-2	328	BK	I	Op.
				14.06.78	3	-2	624			
				22.06.78	4	-2	480			
War.H.	29.06.09	69	männl.	09.01.78	3	12	644	BK, Adeno	II	Op. 10.01.78
				18.01.78	3	-2	1337			
				24.01.78	- 2	2,2	820			
Wet.O.	13.11.97	80	männl.	28.01.77	4	13	-	BK	III	
Wio.H.	09.09.17	61	weibl.	06.02.73	3	2,1	697	BK, Klein- cellig	IV	inoperabel

Name	Geburt	Alter	Geschlecht	Datum	ATF	OMA	Per	histologie	Stadium	commentaire (02)
Wiemann	20.06.50	29	männl.	21.02.79	5	-2	-	Abzesse	VII	
Wiemann	24.10.29	49	männl.	21.11.78	3	2	1239	BR	---	
				19.03.79	4	2,3				
Dem.A.	17.11.22	55	weibl.	13.10.77	2	8	278	BR, Alveol-	---	Stadium III
				14.11.77	-	9	-	lar-Oe		
Dieck	22.07.09	77	männl.	23.09.76	3	-2	854	BR	IV	

III = Vergleichskollektiv

TUMOR-ASSOZIIERTE ANTIGENE IM SERUM VON PATIENTEN MIT LUNGENKARZINOM

VK = Vergleichskollektiv (benigne Erkr.), Stadium I $\circ$ II Δ III $\square$ IV ∇

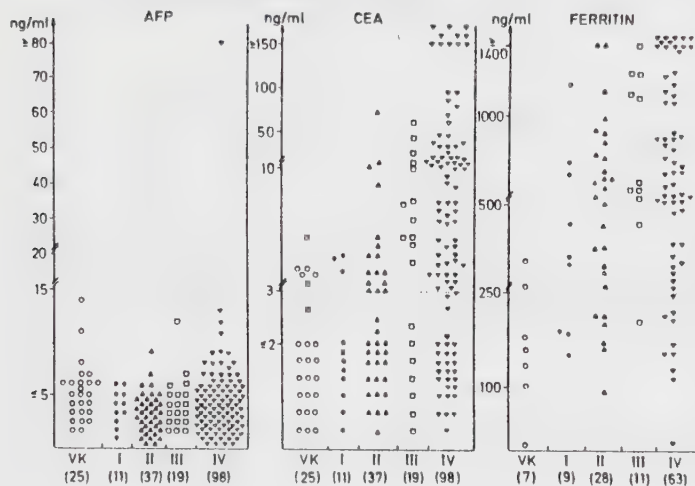


Abb. 38. Serumwerte bei Patienten mit Lungenerkrankungen für AFP, CEA und Ferritin, Anzahl in Klammern

Tabelle 8

Geschlechts- und Altersverteilung sowie Serumwerte von AFP, CEA und Ferritin bei Patienten mit benignen und malignen Lungenerkrankungen

Parameter		Vergl.Koll.	Bronchialkarzinomstadien			
			I	II	III	IV
	N	25	11	37	19	98
	m./w.	17/8	9/2	27/10	16/3	80/18
Alter	($\bar{x} \pm s$)	49.0 $\pm$ 17.0	60.4 $\pm$ 8.3	62.7 $\pm$ 9.1	61.8 $\pm$ 10.4	62.2 $\pm$ 10.1
AFP	N	25	11	37	19	97
	($\bar{x} \pm s$)	5.7 $\pm$ 2.5	4.3 $\pm$ 1.2	3.7 $\pm$ 1.6	3.5 $\pm$ 1.5	4.4 $\pm$ 2.4
	$\tilde{x}$	-	3.7	3.2	3.2	3.3
	VK	43.9%	27.0%	42.2%	42.7%	54.3%
CEA	N	25	11	37	19	98
	($\bar{x} \pm s$)	2.6 $\pm$ 1.2	2.8 $\pm$ 1.3	5.5 $\pm$ 11.6	11.5 $\pm$ 16.1	121.7 $\pm$ 633.0
	10PZ	-	1.2	1.2	1.4	1.5
	$\tilde{x}$	-	2.2	2.5	4.5	6.8
	90.PZ	-	6.3	8.5	40.5	142.6
	VK	46.4%	45.8%	211.1%	140.4%	520.0%
Ferritin	N	7	8	28	11	65
	$\bar{x}$	162.6	446.8	587.3	835.0	1079.3
	$\pm s$	94.7	354.0	376.2	422.4	1303.2
	VK	58.3%	79.2%	64.0%	50.6%	120.7%

PZ = Perzentil; $\tilde{x}$ = Median; VK = Variationskoeffizient

1 Patient mit AFP = 103 ng/ml wurde nicht berücksichtigt

2.4.5. Serumbestimmungen

Eine Zusammenstellung der wichtigsten klinischen Angaben und Serumwerte für die untersuchten Patienten findet sich in Tab. 7 (alle Patientendaten); die Serumbefunde von AFP, CEA und Ferritin sind in Abb. 38 dargestellt und in Tab. 8 zusammen mit den Alterswerten zusammengestellt.

2.4.5.1. Normalkollektiv

Für die Bestimmung von AFP wurde in einem Kollektiv von 140 Normalpersonen im Alter von 25 bis 85 Jahren in 86,4 % der Fälle ein Serumspiegel unter 5 ng/ml, bei den restlichen 19 Personen ein Wert zwischen 5 und 14 ng/ml gefunden. Aufgrund dieser Befunde wurde der AFP-Normalbereich bis 15 ng/ml festgelegt.

Bei 60 Probanden im Alter zwischen 20 und 45 Jahren wurde ein mittlerer CEA-Spiegel von $1,4 \pm 0,7$ ng/ml mit sämtlichen Werten unter 3 ng/ml gefunden.

Der Normbereich wurde deshalb bis 3 ng/ml festgelegt.

In einem Normalkollektiv von 94 Probanden im Alter zwischen 20 und 52 Jahren wurde mit unserem eigenen Ferritin-RIA eine mittlere Serumkonzentration von $127,7 \pm 48,2$ ng/ml (Var.-Koeff. 37,8 %) gefunden. Dem entsprach ein Median von 123,9 ng/ml und ein mittlerer 90 %-Bereich von 53,6 (5. PZ) und 220,6 (95. PZ) ng/ml. Der Normbereich wurde deshalb bis 250 ng/ml festgelegt. Da einerseits unser eigener Ferritin-RIA eine gute Übereinstimmung der Bestimmungen mit dem kommerziellen Ferritin-IRMA (Fa. Hoechst) aufwies und andererseits wegen der erst späteren Entwicklung unseres Testes nicht mehr genügend Patientenserum für die Ferritin-Bestim-

mung zur Verfügung standen, wurden deshalb nur die Patienten-Ferritin-Serumwerte des kommerziellen Testes verwandt.

2.4.5.2. Vergleichskollektiv mit benignen Lungen-Erkrankungen

Im Vergleichs-Kollektiv von 25 Patienten (17 m. / 8 w.) mit verschiedenen nicht-malignen Lungenerkrankungen (8 x Tbc, 4 x benigner Tumor, 3 x Bronchiektasien, 3 x Abszeß, 2 x Lungenzysten, 2 x Pneumonie, 2 x Schwarte) und einer etwas jüngeren Altersverteilung lagen die AFP-Serumspiegel mit $5,7 \pm 2,5$ ng/ml alle im Normbereich, die CEA-Spiegel bei $4,3 \pm 1,2$ ng/ml und damit bei 6 Patienten über der Normgrenze bis maximal 7 ng/ml und die Ferritinspiegel bei nur 7 bestimmten Fällen bei $162,6 \pm 94,7$ ng/ml und damit ebenfalls im Normbereich. (Abb. 38/ Tab. 8)

2.4.5.3. Patienten mit Bronchialkarzinom

2.4.5.3.1. Altersverteilung

Von den 165 Patienten mit Bronchialkarzinom waren 131 männlichen, 34 weiblichen Geschlechts. Der Alters-Median lag bei 62,1 Jahren mit den zentralen 80 % der Fälle zwischen 47,8 (10. PZ) und 73,6 (90. PZ) Jahren. Die Altersverteilung entsprach annähernd einer Normalverteilung ($\chi^2 = 10,3$; $p > 0,10$). Zwischen den wegen zu niedriger Fallzahl vereinigten Stadiengruppen I + II und III + IV bzw. zwischen dem männlichen und weiblichen Kollektiv bestand in bezug auf die Altersverteilung kein signifikanter Unterschied.

2.4.5.3.2. Alpha-Fetoprotein (Abb. 38, Tab. 8)

Bis auf eine Ausnahme (Pat. Käs.M., Gruppe IV: 103 ng/ml;

Lebermetastasen) zeigten alle anderen Patienten normale AFP-Serumspiegel unter 15 ng/ml. Die Medianwerte der 4 Stadien-gruppen lagen für Gr. I-IV mit 3,7, 3,2, 3,2 und 3,3 sehr nahe beieinander, die Gruppenwerte waren annähernd normal verteilt. Zwischen den Kollektiven der Gruppen I-IV und I/II und III/IV und zum Vergleichskollektiv bestand kein signifikanter Unterschied.

2.4.5.3.3. Carcinoembryonales Antigen (Abb. 38, 39; Tab. 8, 9)

Der unter 2.4.4.3. beschriebene CEA-Radioimmunoassay, der mit Hilfe von CEA-Antigen- und Antikörper-Präparationen aus bzw. gegen Lungenkarzinomextrakt hergestellt wurde, zeigte bei Untersuchung von verschiedenen Tumorpatienten-Kollektiven im Vergleich zu einem seit Jahren etablierten Colonkarzinom-CEA-RIA keine signifikanten Meßwert-Unterschiede. Wie aus Abb. 39 hervorgeht, wurden für diese Vergleichskollektive über den gesamten Meßbereich von 2 bis über 80 ng/ml gut vergleichbare Konzentrationen gemessen. Die für 119 verschiedene Patientenserien ermittelten Konzentrationen wiesen eine linearen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,935$ bzw. einen Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten von $r_s = 0,969$ auf ($p < 0,001$). Wegen dieser guten Übereinstimmung beider Radioimmunoassays und dem Umstand, daß der Lungenkarzinom-CEA-RIA erst im Laufe der Dissertationsarbeit zu einem Zeitpunkt fertiggestellt wurde, als nicht mehr sämtliche Serien des Lungenkarzinom-Patientenkollektivs zur Verfügung standen, wurden zur Auswertung der CEA-Befunde bei den Patienten mit Bronchialkarzinom nur die mit dem Colonkarzinom-CEA-RIA ermittelten Werte verwandt. Die Werte aller Gruppen (ohne Gruppe I) waren entweder annähernd normal verteilt (R/S-Verfahren n. David, Lit. Sachs) (221) oder lognormalverteilt (Gr. II, IV), sie zeigten eine linkssteile Verteilung (Gr. III) mit den Zentral-

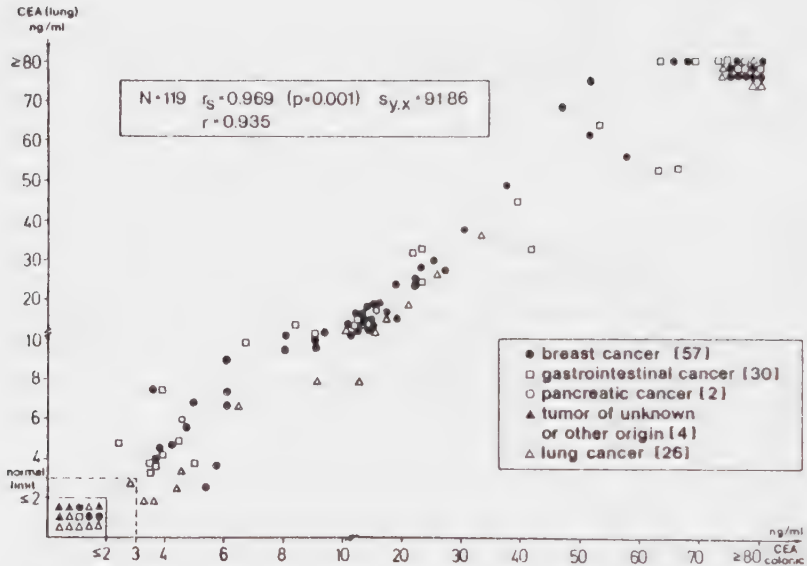


Abb. 39. Korrelation von CEA-Spiegeln bestimmt mit einem Referenz-CEA-CO-Radioimmunoassay (Abszisse) und einem lungenkarzinombezogenen CEA-BC-Radioimmunoassay (Ordinate) bei verschiedenen Tumorpatienten-Kollektiven mit Mamma-karzinom, gastrointestinalem Karzinom, Pankreaskarzinom, Bronchialkarzinom und Karzinomen mit unbekanntem Primärtumor.

Tabelle 9

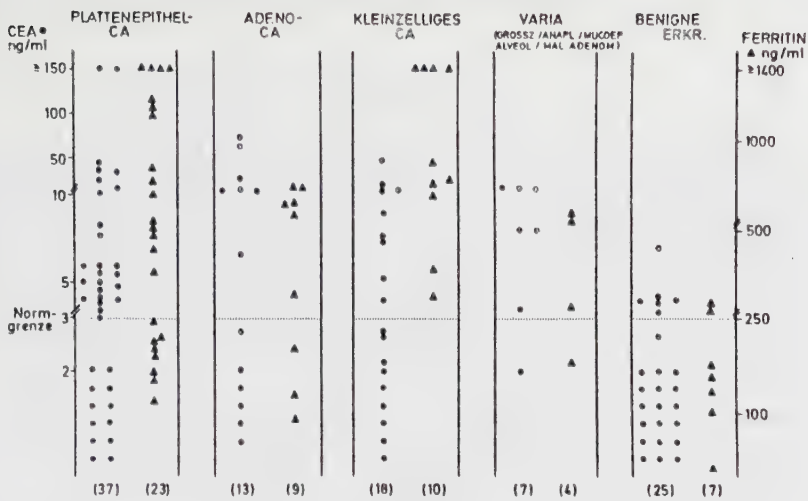
Signifikanz-Tabelle der CEA- und Ferritin-Serumwerte bei Patienten mit verschiedenen benignen und malignen Lungentumoren

Histologie	Adeno	Kleinz.	Varia	Benigne
CEA				
Pl.-Epi.	NS	NS	NS	$p < 0.001$
Adeno	-	NS	NS	$p < 0.01$
Kleinz.	-	-	NS	$p < 0.005$
Varia	-	-	-	$p < 0.001$
Ferritin				
Pl.-Epi.	NS	NS	NS	$p < 0.05$
Adeno	-	$p < 0.01$	NS	$p < 0.05$
Kleinz.	-	-	$p < 0.05$	$p < 0.001$
Varia	-	-	-	NS

werten (Mittelwert, Median, Dichtemittel) im Normalbereich bzw. niedrig-pathologischen Bereich und einer weit auslaufenden Verteilung in den höher pathologischen Bereich mit niedrigen Besetzungszahlen. Die wichtigen Parameter Median (= 50%-Punkt) und 90. Perzentil nahmen von Gruppe I nach IV von 2,2/6,3 (Gr. I) über 2,5/8,5 (Gr. II) und 4,5/40,5 (Gr. III) nach 6,8/142,6 (Gr. IV) ng/ml deutlich zu. Nach der Verteilung nahm der Anteil von Normalwerten von Gruppe I-IV (< 3 ng/ml : 70, 60, 37, 28%) ständig ab und der der erhöhten Werte über 10 ng/ml ständig zu (> 10 ng/ml : 0,8, 21, 39%). Nach statistischer Prüfung (Kolmogoroff-Smirnoff-Test) bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dem Vergleichskollektiv und den Gruppen I, II und III, ferner nicht zwischen Gruppen III und IV; signifikante Unterschiede bestanden jedoch zwischen dem Vergleichskollektiv bzw. den Gruppen I/II und der Gruppe IV ($p < 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,001$) sowie zwischen den vereinigten Gruppen I/II und III/IV ($p < 0,001$).

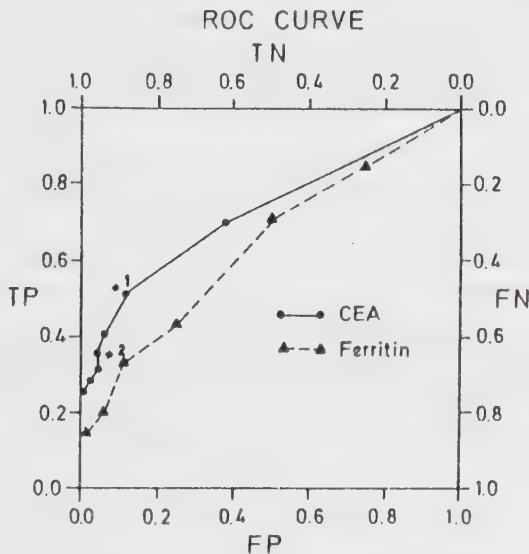
Abb 40 gibt die CEA- (und Ferritin-) Werte von Patienten mit histologisch verschiedenen Lungentumoren wieder. Nach Tabelle 9 bestanden bei der Signifikanz-Prüfung keine signifikanten Unterschiede der Kollektive mit malignen Tumoren, die jedoch alle von den Werten des Kollektivs mit benignen Erkrankungen unterschieden waren ($p < 0,01 - 0,001$).

In Abb 41 wurde das Diskriminanzvermögen der CEA-Serumspiegel zwischen den Patientenkollektiven mit noch lokaliserten (Gr. I/II) und den Gruppen mit fortgeschrittener maligner Erkrankung (Gr. III/IV) anhand einer ROC-Kurve untersucht. Wie aus der Abb. hervorgeht, bestand für den Grenzwert von 6 ng/ml ein brauchbares Unterscheidungsvermögen ($\chi^2 = 21,1$, $p < 0,001$) mit einem positiven prädiktiven Wert von 92% bei einer Prävalenz von 72% (Sensitivität = 51%, Spezifität = 89%).



bb. 40. Verhalten von Serum-CEA und -Ferritin beim Bronchialkarzinom mit verschiedener Histologie und im Vergleich zu benignen Lungenkrankheiten

Diskriminanzvermögen von CEA und Ferritin
beim Bronchialkarzinom
(Klin. Stadium I+II=negativ, III+IV=positiv)



1:CEA-Grenzwert = 6 ng/ml, $\chi^2=21,1$, $p < 0,001$
Prävalenz = 72%; pos. prädiktiver Wert = 92%

2:Ferritin-Grenzwert = 1000 ng/ml; $\chi^2=5,0$, $p < 0,05$
Prävalenz = 68%; pos. prädiktiver Wert = 86%

2.4.5.3.4. Ferritin (Abb. 38, 39; Tab. 8, 9)

Für Ferritin-Bestimmungen standen deutlich weniger Seren zur Verfügung (N/Gruppen I-IV : 8,28,11,65). Alle Gruppenwerte waren nur annähernd normalverteilt (R/S-Verfahren), sie zeigten meist leicht linkssteile Verteilungen. Die Kennwerte Median /90. Perzentil betrugen für die einzelnen Gruppen I-IV 333,3/1050,0 (Gr. I), 562,5/1050,0 (Gr. II), 718,8/1243,8 (Gr. III) und 661,8/1850,0 (Gr. IV) ng/ml. Die Signifikanz-Prüfung im Kolmogoroff-Smirnoff-Test ergab keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen, wenn auch die Mittelwerte der Gruppen I bis IV von 446,8 über 587,3, 835,0 nach 1079,3 ng/ml anstiegen. Auch zwischen den vereinigten Gruppen I/II und III/IV konnte kein Unterschied gesichert werden.

In Abb. 40 sind die Ferritin-Werte von Patientengruppen mit histologisch verschiedenen Lungentumoren vergleichend aufgetragen. Nach Tab. 9 bestanden signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit benignen Tumoren und den Tumorgruppen Plattenepithel-Ca, Adeno-Ca und Kleinzelliges Ca, ($p < 0,05 - 0,001$), ferner zwischen den beiden Gruppen Adeno-Ca und Kleinzelliges Ca, ($p < 0,01$), zwischen dem Kleinzelligen Ca und der Sammelgruppe seltener Tumoren. ($p < 0,05$)

In Abb. 41 wurde das Diskriminanzvermögen der Ferritin - Serumspiegel zwischen den mehr lokalisierten Stadien (Gr. I/II) und den fortgeschrittenen Stadiengruppen III/IV untersucht. Im Vergleich zum CEA-Test ergab sich nur ein geringfügiger Unterschied ($\chi^2 = 5,0$; $p < 0,05$) bei einem Ferritin Grenzwert von 1000 ng/ml mit einem pos. prädiktiven Wert von 86 % bei einer Prävalenz von 68% (Sensitivität = 33%, Spezifität = 89 %).

2.4.5.3.5. Multivariate Prüfungen (Tab. 10)

Als dichotomisierte Verteilungen wurden in die Prüfung einbezogen das Geschlecht (männlich/weiblich), Alter (jünger/älter 61 J.), Stadium (I+II/III+IV) sowie die Serumparameter AFP (kleiner/größer 3,5 ng/ml), CEA (kleiner/größer 3 ng/ml) und Ferritin (kleiner/größer 500 ng/ml). Dabei zeigten sich für insgesamt 112 auswertbare Fälle im Chi-Quadrat-Test signifikante Beziehungen zwischen klinischem Stadium und CEA ($p < 0,02$); d.h. es besteht eine signifikante Beziehung zwischen lokalisiertem Stadium und normalen bzw. niedrig-pathologischen CEA-Werten und zwischen fortgeschrittenen Stadien und erhöhten CEA-Spiegeln. Ferner ließ sich eine Beziehung zwischen dem klinischen Stadium und Ferritinwerten sichern ($p < 0,05$). Auf dieser Grundlage zeigte sich eine noch nicht signifikante Beziehung zwischen CEA und Ferritin ($p > 0,05$), aber eine deutliche Tendenz zum Vorkommen höherer CEA-Werte mit höheren Ferritin-Werten, was auch in der noch nicht signifikanten Rangkorrelation zwischen CEA- und Ferritinwerten zum Ausdruck kommt ($r_g = 0,164$, $p > 0,05$, $N = 112$). Schließlich fand sich noch ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und den Ferritinwerten ($p < 0,05$); danach fanden sich bei Männern häufiger höhere Ferritinwerte als bei Frauen. Die beschriebenen Beziehungen sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

2.4.5.3.6. Verlaufskontrollen

2.4.5.3.6.1. CEA

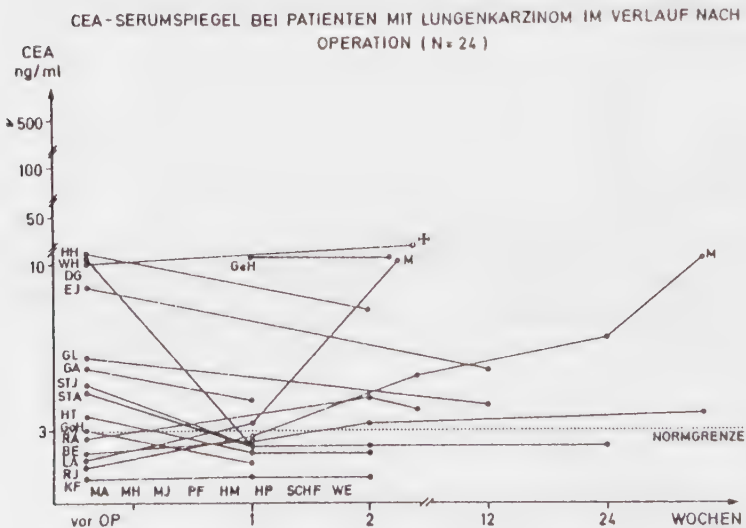
Operable Patienten (Abb. 42). Von 24 untersuchten noch operablen Patienten wiesen 9 (38%) präoperativ erhöhte CEA-Serumspiegel bis maximal 15 ng/ml auf. Postoperativ zeigte sich nach 2-12 Wochen bei 4 Patienten (WH, STJ, STA,

Tabelle 10

BEZIEHUNG ZWISCHEN GESCHLECHT, ALTER, KLINISCHEM STADIUM
UND DEN SERUMKONZENTRATIONEN VON AFP, CEA UND FERRITIN
BEI PATIENTEN MIT BRONCHIALKARZINOM

GESCHLECHT M/W						
ALTER (≥ 61 J.)	NS					
STADIUM (I+II/III+IV)	NS	NS	NS			
AFP ($\geq 3,5$ NG/ML)	NS	NS	NS	NS	<0,05	
CEA (≥ 3 NG/ML)	NS	<0,02	<0,05	NS		
FERRITIN (≥ 500 NG/ML)	NS	NS				
	>0,05					

Abb. 42. Serum-CEA im Verlauf vor und nach Operation wegen Bronchialkarzinom, zunächst im Stadium I und II, später in einigen Fällen Metastasen nachgewiesen (M)



HT) ein CEA-Spiegelabfall in den Normbereich und bei vier weiteren Patienten (HH, EJ, GL, GA) ein Spiegelabfall innerhalb des pathologischen Bereichs. Bei 9 Patienten verblieben die CEA-Spiegel ohne große Änderungen im Normbereich bzw. bei einem Patienten (GeH) im pathologischen Bereich. Von den übrigen Patienten verstarb einer (GeH) bei konstant pathologischem CEA-Spiegel-Wert (17 - 23 ng/ml), bei zwei Patienten (JA, RJ) mit präoperativ normalen CEA-Werten kam es nach 5 bzw. über 30 Wochen zu einem CEA-Spiegel-Anstieg auf über 10 ng/ml; bei beiden Patienten konnte im Verlauf eine Fernmetastasierung gesichert werden. Zwei weitere Patienten (RA, BE) wiesen nur leichte CEA-Spiegelschwankungen um die Normgrenze auf.

Inoperable Patienten Stadium IV (Abb. 43). Von 6 untersuchten inoperablen Patienten mit Stadium IV zeigte nur einer (GF) bei der Erstuntersuchung einen normalen CEA-Wert unter 2 ng/ml, die anderen (83 %) wiesen pathologische Spiegel zwischen 4 und 40 ng/ml auf. Im Verlauf stieg der CEA-Spiegel bei Pat. KR von 40 auf über 500 ng/ml an, während die anderen Patienten weniger deutliche CEA-Spiegelanstiege im deutlich pathologischen Bereich über 10 ng/ml bis auf eine Ausnahme (BW) entwickelten. Interessant ist auch die Beobachtung, daß Patient GF mit anfangs normalem CEA-Spiegel trotz gesichertem Stadium IV im Verlauf relativ spät einen pathologischen CEA-Wert bis maximal 12 ng/ml entwickelte.

2.4.5.3.6.2. Ferritin

Operable Patienten (Abb. 44): Von 12 untersuchten Patienten wiesen acht (67 %) einen erhöhten Ferritinspiegel bis maximal 1144 ng/ml (GL) auf. Im Verlauf über 2 - 12 Wochen zeigten die meisten Patienten einen Ferritin-Spiegelanstieg gegenüber der Anfangskonzentration, während bei einem Patienten (RJ) ein Spiegelabfall von 671 auf 280 ng/ml (bei gleich-

zeitigem CEA-Spiegelanstieg von kl. 2 auf 13 ng/ml) und bei einem weiteren Patienten (GL) ein geringerer Spiegelabfall von 1144 auf 662 ng/ml zu beobachten war. Bei drei weiteren Patienten (TM, WE, SP) kam es nach anfänglichem Spiegelanstieg (TM, WE) bis zu 2 Wochen postoperativ zu einem deutlichen (TM, 1030 auf 304) bzw. leichten Abfall des Ferritin-Spiegels. Insgesamt ist eine Tendenz zu niedrigeren Ferritin-Spiegeln nach einer gewissen postoperativen Zeit unverkennbar, wenn auch wegen der niedrigen Fallzahl und zu kurzer Beobachtungszeit keine sicheren Schlüsse erlaubt sind.

Inoperable Patienten Stadium IV (Abb. 45): Von den nur vier untersuchten Patienten lagen alle Ferritinspiegel im pathologischen Bereich bis maximal 1562 ng/ml. Im Verlauf zeigt ein Patient (KR) einen weiteren deutlichen Spiegelanstieg von 889 auf 3186 ng/ml, ein weiterer Patient (GF) nur einen geringfügigen Anstieg von 309 auf 363 ng/ml, während bei Patient BW eine gleichbleibende pathologische Konzentration um 1550 ng/ml und bei Patient LB ein Spiegelabfall von 748 auf 449 zu beobachten war. Die geringe Fallzahl und die unterschiedlichen Verläufe lassen keinerlei Schlüsse zu.

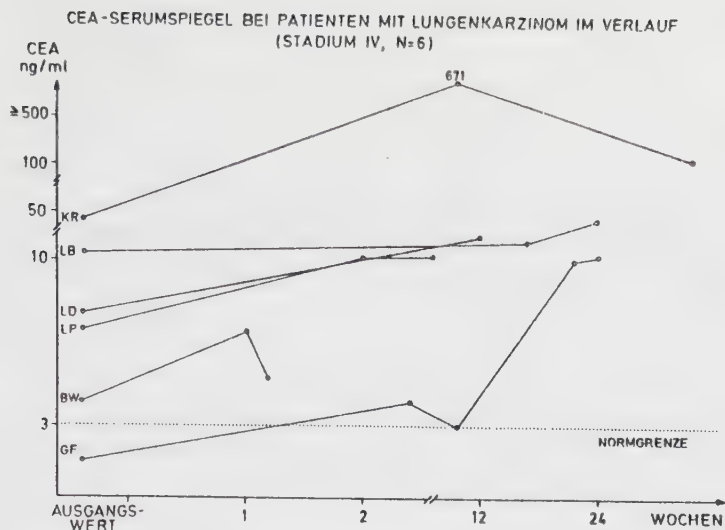


Abb. 43. Serum-CEA im Verlauf beim Bronchialkarzinom, Stadium IV

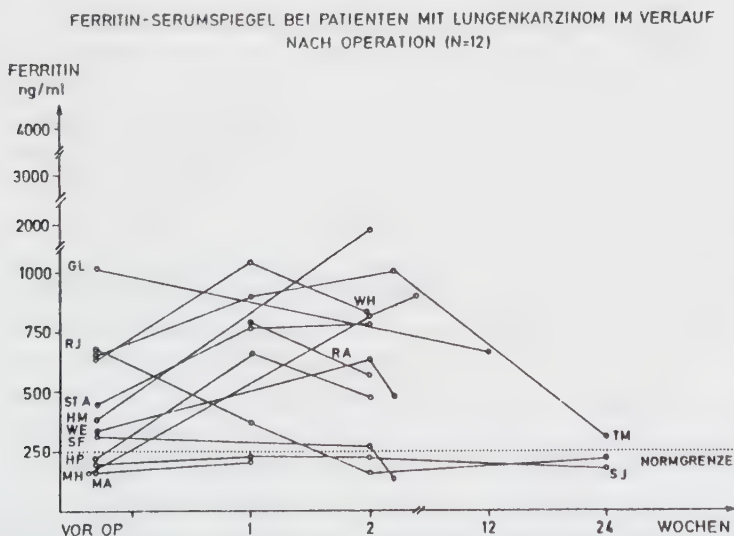


Abb. 44. Serum-Ferritin im Verlauf vor und nach Operation wegen Bronchialkarzinom

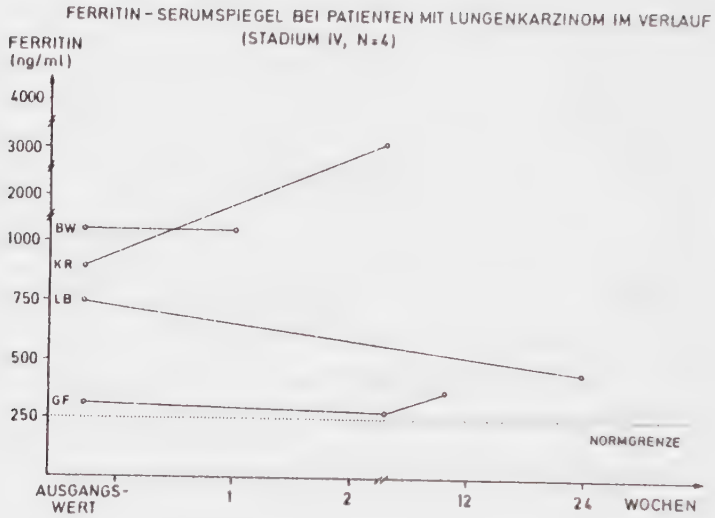


Abb. 45

Serum-Ferritin im Verlauf beim Bronchialkarzinom, Stadium IV

2.5. Diskussion

2.5.1. LCAA-1 (Ferritin)

Ein mit einem Referenz-Antiferritin-Antiserum identifiziertes Antigen LCAA-1 konnte mit unseren Antiseren Nr. 2-6 und 12-14 in den salinen Extrakten LCEs bzw. LCEAS (KCL-Ammoniumsulfat-fällung) nachgewiesen werden, wobei die Hauptmenge des Ferritins unter Gelfiltration in Fraktion II unter Sepharose 6B-Bedingungen nach Ausschluss einer Void-volume-Fraktion bzw. mit Sephadex G 200 in der ersten hochmolekularen Fraktion gefunden wurde. Im Extrakt LCEAS schien die Verteilung von Ferritin in Richtung auch niedermolekularer Fraktion (G200/II und III) wohl infolge Degradation verschoben zu sein. Spuren von LCAA-1 konnten jedoch auch in den Normalextrakten NLE und LCEN nachgewiesen werden, wohingegen nach Absorption eines gegen die LCEs-G 200/I-Fraktion gerichteten Antiserums (Nr. 4) diese Reaktion in der Ouchterlony-Doppeldiffusion nahezu aufgehoben war. Dieser letzte Befund weist darauf hin, daß es offensichtlich eine ganze Familie von Isoferritinen mit zum Teil unterschiedlicher Antigenität gibt.

Ferritin stellt neben dem Hämosiderin, ein Ferritinabbauprodukt, das wichtigste upiquitäre Eisenspeicherprotein des Körpers vieler Spezies dar, das eine zentrale Rolle im Eisenmetabolismus eukaryotischer Zellen spielt. (Übersicht bei Munro und Linder 1985). Trotz einer physiologischen Heterogenität von Ferritinen verschiedener Organe und Spezies aufgrund einer Strukturheterogenität des Apoferritins zeigt sich jedoch eine große morphologische Ähnlichkeit. Ferritin besteht aus einer 30 Ångström dicken sphärischen Proteinhülle (Apoferritin) in Form eines pentagonalen Dodekahedrons (Molekulargewicht um 450 000) mit einem Durchmesser von 130 Ångström und einem Eisenkern von bis zu 5 000 Eisenatomen aus Kristallen von Ferro-Oxyhydroxidphosphat. Die Proteinschale besteht aus 24 Untereinheiten von einem Molekulargewicht zwischen 18 000 und 21 000 Daltons. Durch chromatographische, elektrophoretische und immunologische Verfahren konnte die Heterogenität verschiedener Ferritine (Isoferritine) bewiesen und auf die Primärstruktur (ungefähr 20

unterschiedliche humane Isoferritine, pI 4,8-5,8) zurückgeführt werden. Nach den Untersuchungen von Drysdale (053) werden zwei Subtypen der Leichtketten mit leicht unterschiedlichem pI und Molekulargewicht postuliert: Die H-Subeinheit (Mol. Gew. 21 000) scheint in mehr sauren Isoferritinen (Herz, Niere, Pankreas, frühe Plazenta, HeLa-Zellen) und der L-Subtyp (Mol. Gew. 19 000) in mehr basischen Isoferritinen (Leber, Milz) zu dominieren. Durch eine unterschiedliche Mischung dieser beiden Leichtketten-Untereinheiten in verschiedenen Verhältnissen sollen alle verschiedenen Isoferritine mit unterschiedlichen pI-Werten entstehen, wobei der basischste Typ ein Homopolymer der L-Untereinheit und der sauerste Typ ein Homopolymer der H-Untereinheit darstellen soll. Zusätzlich können Isoferritine, vor allem aber Serumferritine, noch glykosyliert werden (Kohlenhydrate: Hexosamine, Hexosen, Frukosen) und an Concanavallin A binden. Wegen der physikochemischen Unterschiede von Isoferritinen wurden auch immunologische Unterschiede postuliert. Dieser Nachweis konnte jedoch nur sehr schwer mit polyklonalen Antikörpern geführt werden, weil eine intensive Kreuzreaktion zwischen den Isoferritinen besteht; und zwar sowohl zwischen den Isoferritinen verschiedener Organe einer Spezies als auch zwischen den Isoferritinen verschiedener Spezies. (Drysdale 054). Immunisierungen von Kaninchen mit Isoferritin-Mischungen aus sauren und basischen Komponenten schienen überwiegend Antikörper gegen basische Isoferritine zu bilden; demgegenüber beschrieben andere Autoren Antikörper gegen saure Isoferritin-Antigen-Determinanten bei Immunisierung von Meerschweinchen oder Schafen. Insbesondere konnte durch Immunisierung von Meerschweinchen mit HeLa-Zell-Ferritin ein Antiserum gewonnen werden, daß nach Absorption mit basischen Isoferritin (Leber) nur noch mit HeLa-Zell-Ferritin und sauren Herz-Isoferritin reagierte (Hazard et al 107). Bei Einsatz solcher Antisera in einem Ferritin-RIA zur Serum-Ferritin-Bestimmung zeigten sich mit den beiden unterschiedlichen Antisera unterschiedliche Inhibitionskurven.

Das Flussdiagramm der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Extrakt-Präparation und der chromatographischen Reinigung von ICAA-1 aus salinen Lungentumorextrakten folgt nicht den

konventionellen unterschiedlichen Methoden, wie sie zur Ferritin-Präparation beschrieben wurden, da die drei verwandten Extraktionsmethoden (ICES, ICEAS, LCEP) den schonendsten und am häufigsten beschriebenen Verfahren bei der Verarbeitung von Jungentumoren zur Suche nach Tumorantigenen entsprechen und LCAA-1 nur eines der später identifizierten tumorassoziierten Antigene darstellt. Für die ausschliessliche Ferritin-Gewinnung aus verschiedenen Geweben haben die meisten Autoren nach Herstellung des Gewebshomogenats eine Hitzefällung ($70-80^{\circ}\text{C}$, 10 min) beschrieben, nach der sodann das Koagulat verworfen und nur der Überstand nach Zentrifugation weiterverwandt wird (Munro/Linder 1955). Ferritin kann in diesem Überstand entweder durch Ammoniumsulfat gefällt und nach Wiederauflösung durch Cadmiumsulfat-Zusatz im Präzipitat als kristallines Ferritin bzw. im Überstand als nicht kristallines Ferritin erhalten werden (Granick 1967), oder durch ein Zentrifugationsverfahren (78000 g, 1 h, Ferritin im Präzipitat, Wiederauflösung und Nachzentrifugation bei 95 000 g, 1 h; Penders et al 1966) oder aber nach pH-Einstellung auf 4,8 im Überstand über CM-Zellulose weiter gereinigt, dann durch 50% Ammoniumsulfat gefällt und nach Wiederauflösung weiter über Sephadex G 200 oder auch Sepharose 4B und abschliessender Zentrifugation (bei 100 000 g, 4 h) erhalten (Linder und Munro 1955) oder mit Hilfe eines Antikörpers wie bei uns gereinigt werden (Drysdale und Munro 1952). Bei der Präparation von Ferritin aus Tumorgewebe und der Suche nach einem möglichen immunologischen Unterschied dieser Isoferritine im Vergleich zu Isoferritinen aus entsprechenden oder anderen Normalgeweben ist es von besonderer Bedeutung, darauf zu achten, dass die Extraktions- und Reinigungsverfahren nach schonendsten Gesichtspunkten ausgewählt werden, ohne dabei besonders auf eine nur hohe Ausbeute zu achten. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu betonen, dass nach den Untersuchungen von Frenkel et al (1968) schon die Hitzefällung, wie sie den meisten Ferritin-Präparationen zugrunde liegt, zu einem vorwiegenden Verlust von sauren Isoferritinen führen soll. Dass auch die Fällung von Ferritin mit Hilfe von 50%iger Ammoniumsulfat-Lösung, wie sie bei einem Teil der oben beschriebenen konventionellen Verfahren üblicherweise angewandt wird, bei weitem nicht

vollständig ist, zeigt sich auch an dem deutlichen immunologischen Nachweis von Ferritin in unseren LEAS-Fraktionen, bei denen ja gerade das AS-Präzipitat verworfen wurde. Aus all diesen Gründen ist die von uns verwendete Ferritin-Präparation im LEAS-Verfahren die schonendere Methode zu einer breiten und möglichst vollständigen Isoferritin-Gewinnung gewesen.

Unter der Annahme einer möglichen immunologischen Heterogenität verschiedener Isoferritine ist das zur Reinigung der vorgereinigten Ferritin-Präparationen eingesetzte Immunoabsorptionsverfahren mit Hilfe von an CNBr, aktiv. Sepharose 4B fixierten Antiferritin-Antikörpern ein kritischer Punkt im Reinigungsverfahren, dies umso mehr, wenn zum Beispiel Antikörper, die gegen Leberferritin oder andere Isoferritine aus Normalgeweben gerichtet sind, verwandt werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwandten Antiferritin-Antikörper entstammten jedoch einem Antiserum, dass gegen gepoolte Ferritin-Sammelfraktionen aus salinen Lungentumorextrakten hergestellt worden war. Überdies konnte durch Immunodiffusions- wie durch radioimmunologische Ferritin-Untersuchungen mit Hilfe dieses Antiserums als auch mit anderen Referenz-Antiferritin-Antiseren gezeigt werden, dass sich alle Ferritine an die Immunoabsorptionssäule banden, da sich nach Ausschluss einer Überladung der Säule in der von der Säule eluierten Vorfraktion (C 14/I) kein Ferritin mehr befand. Die Übereinstimmung der analytischen Ferritinbefunde unter Verwendung verschiedener Antiferritin-Antiseren einschliesslich eines Referenz-Antiferritin-Serums belegen deshalb, dass in Bezug auf die hier untersuchten Extrakte Ferritine aus Tumor- wie Normalgewebe einen Grossteil identischer Antigendeterminanten auf ihrer Oberfläche tragen. Dass daneben möglicherweise spezifischere Antigendeterminanten auf den Isoferritinen aus Tumorextrakt vorkommen können, zeigt sich in dem Umstand, dass die Absorption der meisten Antitumorferritin-Antiseren mit normalem Lungengewebeextrakt eine zumindest in der Immunodiffusion nachweisbare Kreuzreaktion gegen normales Ferritin unterdrückte, wohingegen die Reaktion gegen Tumorextrakt-Ferritin nahezu vollständig erhalten blieb (Abb. 13 E, Antiserum Nr. 4). Bei der Isolierung und Reindarstellung der Ferritin-Präparation mittels der Antikörper-beladenen CNBr,-

aktiv. Sepharose 4B-Säulen wird von den meisten Autoren zur Desorption gebundener Antigene eine pH-Änderung meist in Form eines Glycin-HCl-Puffers (0,2m + 0,15m NaCl, pH 2,8) verwendet (Ruoslahti 278). Dieses Verfahren erwies sich zur Desorption von gebundenem Ferritin als völlig unbrauchbar und führte zu einem Antigenitätsverlust wohl infolge Zerlegung von Ferritin in seine Untereinheiten. Erst bei Verwendung chaotroper Ionen als 3,0m KSCN in phosphatgepufferter Kochsalzlösung konnte gebundenes Ferritin vollständig und intakt desorbiert werden. Diese Beobachtung stimmt mit den Angaben von Yoshino et al (267) und Worwood et al (262) überein.

Für die empfindliche Messung von Ferritin vor allem in Serumproben sind praktisch nur radio- oder enzymimmunologische Verfahren brauchbar (Theriault und Page 234, Watanabe et al 252, Anaokar et al 005, Lee und Burgett 152). Unter den radioimmunologischen Verfahren, die meist mit dem Isotop J-125 durchgeführt werden, unterscheidet man den Radioimmunoassay, bei dem das Antigen markiert wird, oder den immunoradiometrischen Assay, bei dem der oder einer der Antikörper markiert wird (2-site-IRMA). Die meisten Erstbeschreiber von radioimmunologischen Ferritinmessverfahren entwickelten einen Radioimmunoassay, bei dem als Markierungsverfahren das von uns verwandte Chloramin-T-Verfahren (Hunter und Greenwood 116) angewandt wurde (zum Beispiel Marcus und Zinberg 166, Niitsu et al 189). Inzwischen berichteten weitere Untersucher über Ferritin-RIA unter Verwendung desselben Verfahrens (Halliday et al 101, Deppe et al 048). Andere Autoren berichteten über Schwierigkeiten mit dem genannten Verfahren (Guilleux et al 097, Ghielmi et al 080) und empfahlen deshalb das Markierungsverfahren von Bolton und Hunter (022), bei dem jodiertes N-Succinyl-3-(H-hydroxy-5-(125-)jodophenyl)-propionat (Bolton-Hunter-Reagenz) zur Markierung an Protein (freie Aminogruppen) verwandt wird. (Bolton et al 023, Frenkel et al 069)

Dieses Verfahren ist jedoch aufwendiger als das Chloramin-T-Verfahren, mit dem wir mehrmals ohne grosse Schwierigkeiten Markierungen von Ferritin mit allerdings geringeren Ausbeuten von 5-20% der eingesetzten Radioaktivität (spezifische Aktivi-

tät 5-20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein) durchführen konnten. Wiederum andere Autoren (Addison et al 1971, Miles et al 1975, Saab et al 1975, Dunn und Boden) gaben dem radioimmunometrischen Verfahren den Vorzug, wie es auch dem von uns verwandten kommerziellen Ferritin-IRMA (Riagnost, Behringwerke) zugrunde liegt. Dieses Verfahren hat allerdings den Nachteil des sogenannten Hook-Effektes, durch den höhere Ferritin-Konzentrationen unter Umständen zu niedrig gemessen werden, weil es bei hoher Antigenkonzentration zu einem Lösen von Antigen von der festen Phase (1. Antikörper niedriger Affinität) zugunsten einer Bildung von löslichen Immunkomplexen mit dem markierten 2. Antikörper kommt (Casey et al 1977).

Der in der vorliegenden Arbeit geführte Nachweis von einem ferritin-ähnlichen tumorassoziierten Antigen LCAA-1 ist in Übereinstimmung mit einem der drei Lungentumor-assoziierten Antigene (TAA-1) der Arbeitsgruppe von Veltri et al (1978). Diese Autoren stellten KCl-lösliche Extrakte aus Plattenepithelkarzinomen her und verwandten zusätzlich eine 50%ige Ammoniumsulfat-Fällung nach den Erstbeschreibern dieser Technik von Yachi et al (1976). Mit dieser Technik fanden sie im 50%igen Ammoniumsulfat-Überstand lösliche Antigene, von denen das erste (TAA-1) nicht identifiziert werden konnte und in Mamma-Ca, Colon-Ca, Cervix-Ca und Kopf/Nacken-Ca, aus Extrakten, nachweisbar war. TAA-2 zeigte wie bei uns eine Kreuzreaktion mit Antiferritin-Serum und TAA-3 mit Antilaktoferrin-Serum. Diese beiden letzten Antigene waren ausschliesslich in Lungenkarzinomextrakten nachweisbar. In der Anionenaustauscherchromatographie mittels DEAE-Zellulose eluierten alle drei Antigene in einem einheitlichen Peak (2,0,4m NaCl). Auf Grund der dann erfolgten Gelfiltration mit Sephadex G 150 konnte TAA-2 (Ferritin) ausschliesslich im ersten Ausschluss-Peak nachgewiesen werden. Dieser Befund stimmt mit unseren Erfahrungen bei der Gelfiltration von LCAA-1 im LCES-Extrakt überein und passt auch zu dem für Ferritin bekannten hohen Molekulargewicht von 450 000 Daltons. In ihrer Arbeit diskutieren die Autoren, dass TAA-2 im Vergleich zu Leberferritin eine saurere elektrophoretische Mobilität in der Immunelektrophorese aufwies. Diese vergleichenden Untersuchungen wurden in unserer Arbeit nicht durchgeführt.

In der immunoelektrophoretischen Auftrennung (Abb.14) wies jedoch unser LCAA-1 eine relativ breite Präzipitationslinie im α_1 - β -Bereich auf.

Linder et al (156) untersuchten die Konzentration, Struktur und Eisensättigung von Ferritinen aus normaler Lunge und verschiedenen Lungentumoren (hauptsächlich Plattenepithelkarzinom, ein Adenokarzinom, einige undifferenzierte Karzinome) verschiedener histologischer Grade (II, III, IV), wobei die übliche Ferritin-Isolierung mittels Hitze- und Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt wurde. Sie fanden keine klare Beziehung zwischen histologischem Grad oder Tumortyp und dem Eisen-Protein-Quotienten des Tumorferritins. Es zeigte sich eine etwas höhere Eisensättigung für Tumorferritin als im Normalgewebe. Mittels Isoelektrofokussierung unter Verwendung von Ampholyten im pH-Bereich pH 4-7 zeigten sich sowohl im Lungennormal- als auch im Tumorgewebs-Ferritin drei hauptsächlich Banden mit ähnlichen pI (um 4,8; 5,1; 5,5), sowie ähnliche Banden in der Isoelektrofokussierung der Untereinheiten. Die Befunde ergaben somit keine grösseren signifikanten Strukturunterschiede der Ferritine aus Lungennormal- und Lungentumorgewebe. Ein wichtiger Einwand gegen diese Untersuchungen im Vergleich zu unseren Untersuchungen und den gefundenen immunologischen Unterschieden zwischen Ferritinen in Lungennormal- und Lungentumorgeweben ist die unterschiedliche Präparationmethode, da hier unter Verwendung von Hitze- und Ammoniumsulfat-Fällung gearbeitet wurde und dadurch eine gewisse Selektion von Ferritinen aus beiden Gewebspräparationen stattfand, so dass bestehende Unterschiede durch diese Einschränkung möglicherweise ausgeblendet wurden (Frenkel et al 1969). Ein weiterer Mangel dieser Arbeit ist, dass mit den isolierten Ferritinen keinerlei immunologische Untersuchungen bzw. Immunisierungen durchgeführt wurden (Ferritin-Identifizierung nur durch Eisenfärbung, die aber zum Beispiel auch Laktoferrine mitanfärbt) und damit ein Vergleich mit unseren Befunden nicht möglich ist.

Serumbefunde

Durch zahllose Untersuchungen konnte gesichert werden, dass der Serumferritinspiegel eine enge Korrelation mit dem Eisengehalt im Knochenmark aufweist (Linder und Munro 154, Walters et al 250). Bei Normalpersonen konnte nach einer grösseren Li-

teraturzusammenstellung (Lamerz 150) bei Männern ein Serumferritin-Mittelwert um 144 ng/ml und bei Frauen von 60 ng/ml gefunden werden, wobei die obere Normwertgrenze nach den meisten Publikationen etwa bei 200-250 ng/ml angegeben wurde. Wegen der relativ guten Korrelation des Serumferritinspiegels mit dem Eisengehalt des Knochenmarks ließ sich ein Abfall des Serumspiegels bei Patienten mit Eisenmangel (Eisenmangelanämie) und signifikante Serumspiegelerhöhungen bei Eisenüberladung (Hämochromatose, Hämosiderose) bzw. unter Eisentherapie, bei aplastischer und hämolytischer Anämie und bei Thalassämie nachweisen. Zusätzlich wurden erhöhte Ferritinspiegel bei benignen Erkrankungen wie Lebererkrankungen (Hepatitis, Leberzirrhose), bei Infektionen und beim Herzinfarkt beobachtet. Mehrere Untersuchungsgruppen beschäftigten sich mit dem Verhalten von Serumferritin bei Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen (Tab. 11, Lamerz 150). Theoretisch kann der bei Tumorpatienten erhöhte Serumferritinspiegel auf eine vermehrte Eisenspeicherung im RES, im Zusammenhang mit einer schlechten Erythropoese, Entzündungserscheinungen und Tumornekrose, ferner mit Tumormetastasen in der Leber oder auch auf eine vermehrte Synthese von Ferritin durch Tumorzellen zurückgeführt werden. Diese letzte Möglichkeit könnte vor allem für Leukämie und M.Hodgkin bewiesen werden. Tab. 11 bringt eine Zusammenstellung der Inzidenzbereiche pathologischer Serumferritinspiegel bei Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß besonders hohe Inzidenzraten bei Patienten mit Leukämien (AML, ALL, CML), M.Hodgkin und beim multiplen Myelom beobachtet wurden. Vor allem beim M.Hodgkin konnte auch eine deutliche Abhängigkeit der Höhe der Ferritinspiegel vom Stadium gesichert werden. (Jacobs et al 119)

Darüberhinaus zeigten auch andere Tumorerkrankungen, vor allem das Hepatom, Mamma-Ca, Keimzelltumoren, Pankreas-Ca, gastrointestinale Tumoren und einige andere in unterschiedlichem Ausmaß erhöhte Serumferritinspiegel. In den meisten Fällen konnte auch eine gewisse Korrelation der Inzidenz und Höhe pathologischer Ferritinspiegel mit der Ausdehnung der Erkrankung sowie auch eine gewisse Beziehung zum klinischen Verlauf gefunden werden. Während die oben beschriebenen Befunde nahezu ausschließlich

mit konventionellen Ferritintesten unter Verwendung von Antikörpern gegen normale Serumferritine bzw. Leberferritin erhoben wurden, berichteten Hazard und Drysdale (188) schon 1977 unter Bezug auf die oben dargelegte Vorstellung der Zusammensetzung von Isoferritinen aus L- und H-Untereinheiten über zwei entwickelte RIAs mit unterschiedlichen Befunden bei Tumormpatienten. Beim ersten RIA handelte es sich um einen Leberferritin-Typ-Assay (Antiserum gegen Leberferritin), beim zweiten um einen HeLa-Zell-Ferritin-RIA (Antikörper gegen HeLa-Zell-Ferritin, absorbiert gegen Leberferritin). Nach diesen Untersuchungen zeigten sich wesentlich höhere Ferritinkonzentrationen in Tumorgewebsextrakten bzw. Tumorpatientenseren mit dem HeLa-Typ-RIA im Vergleich zum Leberferritin-RIA (Faktor 2-5). Aus diesen Untersuchungen schlossen die Autoren, daß Isoferritine aus Tumorseren eine wesentliche Unterscheidung erlaubten im Vergleich zu Seren von Nicht-Tumorpatienten durch den höheren Anteil an H-Untereinheiten. In Fortführung dieser Untersuchungen entwickelten auch Jones et al (124) einen empfindlichen HeLa-Ferritin-Typ-RIA. Mit diesem konnten Tumorextrakte von Lunge und Hepatom untersucht werden, und sie zeigten mehr HeLa-Typ-Ferritin als ihr entsprechendes Normalgewebe. Vergleichende Serumferritinbestimmungen mit dem HeLa-Typ- und Milztyp-Ferritin-RIA ergaben normale HeLa-Ferritin-Werte in Normalseren (um 2ng/ml), aber unterschiedliche Inzidenzraten erhöhter HeLa-Ferritinspiegel bis zu 53 ng/ml in Tumorpatientenseren (AML, Mamma-Ca, darunter auch bei 3 von 15 Lungentumorpatienten).

Bezüglich der mit konventionellen Ferritin-Tests ermittelten Ferritinbefunde bei Patienten mit Lungentumoren fanden Gropp et al (092) pathologisch erhöhte Ferritinspiegel bei 62% von 81 Patienten mit Lungentumoren, wobei der Spiegel bei allen 44 Patienten mit Metastasen und nur bei 38% der 37 Patienten ohne Metastasen erhöht war. Im Verlauf zeigte sich eine gute Korrelation des Ferritinspiegelverhaltens, wobei bei Patienten mit Rezidiv bzw. fortschreitender Erkrankung die Spiegel weiter anstiegen und bei Patienten nach erfolgter Radiotherapie und bei Ansprechen auf die Therapie abfielen. Aufgrund dieser Untersuchungen folgerten die Autoren, daß neben der zu-

sätzlich erfolgten CEA-Bestimmung auch der Ferritinbestimmung eine wenn nicht sogar grössere Bedeutung für die Therapiekontrolle zukommt. Ishitani und Mitarbeiter (118), die Ferritinspiegelbestimmungen bei Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen durchführten und eine obere Normgrenze bei 250 ng/ml festlegten (ein eigener immunoradiometrischer Assay), fanden in 62% von 34 Lungentumorpatienten erhöhte Serumspiegel, wobei ebenfalls die Brauthbarkeit der Ferritinbestimmung für die Prognose und zur Therapiekontrolle belegt wurde. Nach den Untersuchungen von Volpino und Mitarbeitern (245) zeigte sich nur eine begrenzte Brauchbarkeit der Ferritinbestimmungen für diagnostische Zwecke bei Patienten mit Lungentumorerkrankungen. Die Autoren arbeiteten mit einem RIA (BioData, Italien), fanden eine Normobergrenze von 240 ng/ml bei Männern und von 120 ng/ml bei Frauen. Bei der Untersuchung der Seren von 82 Lungentumorpatienten vor und unter Therapie fanden sie präoperativ erhöhte Ferritinspiegel bei zwischen 14 und 40 % (im Mittel 26,8 %) von Fällen mit Plattenepithel-Ca, Adeno-Ca, klein- und großzelligem Karzinom. Beim Vergleich der verschiedenen Stadien waren die erhöhten Inzidenzraten am niedrigsten im Stadium I (16,1 %), am höchsten im Stadium II (42,9%) und etwas niedriger im Stadium III (31,8 %), wobei der Unterschied zwischen Stadium I und III signifikant war. So fanden sich die höchsten Ferritinspiegel bei großzelligen Lungentumoren, die größte Positivitätsrate mit den höchsten Spiegeln in mehr fortgeschrittenen Stadien. Sehr hohe Ferritinspiegel (über 700 ng/ml) waren mit einem inoperablen Zustand korreliert. Bei 43 Patienten mit einer postoperativen Verlaufskontrolle konnten keine eindeutigen Signifikanzen bezüglich Prognose und Ferritinspiegel gesichert werden, wenn auch erhöhte Ferritinspiegel oder die Persistenz einen Monat nach Tumoroperation bei zwei Drittel der Fälle mit einer Progredienz des Tumorleidens vergesellschaftet war. Umgekehrt zeigten normale Ferritinspiegel einen Monat nach Operation eine viel geringere Inzidenz (27 %) eines Rezidivs oder einer Metastasierung an. Serumferritinspiegelanstiege erfolgten entweder gleichzeitig oder kurz vor dem Auftreten einer Metastasierung. Zusammenfassend halten die Autoren die Bedeutung der Serumferritinbestimmung bei Patienten mit Lungentu-

moren aufgrund der niedrigen präoperativen Sensivität (insgesamt 26,8 %) für nur begrenzt.

Der mit unserem eigenen Ferritin-RIA erhobene mittlere Normwert von 127,7 +/- 48,2 ng/ml in einem vorwiegend männlichen Kollektiv von 94 Probanden ist gut mit den Befunden anderer Autoren vergleichbar (Guilleux und Wagner 1977, Kubasik et al 1976). Wegen des vom Hersteller des verwandten kommerziellen Ferritin-IRMA angegebenen breiteren Normbereichs wurde jedoch eine Normgrenze von 250 ng/ml festgelegt. Unter Berücksichtigung dieser Normgrenze lag die Inzidenzrate pathologischer Ferritinspiegel in unserem Lungentumorkollektiv bei 67 % (Stadium I), 79 % (Stadium II), 91 % (Stadium III) und 86 % im Stadium IV gegenüber 2 von 7 Fällen (29 %) in einem Vergleichskollektiv von Fällen mit benignen Lungenerkrankungen, wobei unter Berücksichtigung der histologischen Diagnosen etwa vergleichbar hohe Inzidenzraten beim Plattenepithel-Ca, Adeno-Ca und kleinzelligen Karzinom und einer Gruppe verschiedener maligner Histologie (großzellig, alveolär, anaplastisch) im Bereich zwischen 65 % und 100 % lagen. Auch stiegen unter Berücksichtigung der verschiedenen Stadien die Mittelwerte von Stadium I-IV von 446,8 über 587,3 und 835,0 nach 1079,3 ng/ml an, wobei eine statistische Sicherung der Mittelwertunterschiede (Kolmogoroff-Smirnoff-Test) wegen zu großer Streuungen nicht möglich war. Zum Vergleichskollektiv mit gutartigen Lungenerkrankungen bestand jedoch ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05-0,001$). Von den wenigen Verlaufsfällen konnten bei den operablen Patienten postoperativ zunächst ein deutlicher Ferritinspiegelanstieg in den ersten 1-2- Wochen und erst danach in den untersuchten Fällen ein Spiegelabfall bzw. ständig normale Ferritinspiegel beobachtet werden, während bei den vier inoperablen Fällen (Stadium IV) die Ferritinspiegel ständig im pathologischen Bereich blieben. Der zunächst postoperativ beobachtete Ferritinspiegelanstieg muß auf die entzündlichen Veränderungen im operierten Bereich mit entsprechenden Serumeisenverschiebungen ins RES zurückgeführt werden, wobei interessanterweise ein durch die Blutverluste bei der Operation möglicher Eisenmangel offensichtlich nicht zu einem entsprechenden Ferritinspiegelabfall geführt hat.

Der bei der multivariaten Prüfung der präoperativen Ferritinspiegel (Tab. 10) gefundene signifikante Zusammenhang zwischen Ferritin und Geschlecht (Frauen mit signifikant niedrigeren Ferritinspiegel) unterstreicht noch einmal den oben beschriebenen niedrigen Ferritinmittelwert bei normalen Frauen infolge ständiger niedrigerer Eisenspiegel vor allem während der Menstruation. Insgesamt jedoch deuten die von uns erhobenen Befunde darauf hin, daß Höhe und Häufigkeit pathologischer Serumferritinspiegel eine Korrelation zur Ausdehnung der Tumorerkrankung beim Bronchialkarzinom aufweisen und daß eine gewisse Korrelation des Ferritinspiegelverlaufs mit dem klinischen Verlauf zu erwarten sein könnte, was jedoch durch größere Verlaufsstudien zu belegen wäre.

Abschließend sei erwähnt, daß es sich bei dem schon 1975 erstmals von Buffe und Rimbaud (031) beschriebenen menschlichen hepatischen Glykoferroprotein " α_2 -H-Globulin" mit einem immunsuppressorischen Effekt auf die normale Lymphozytentransformation und erhöhten pathologischen Serumspiegeln bei Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen (vor allem Leukosen) um ein Isoferritin handelt. Ein weiterer Hinweis auf eine größere Bedeutung von Ferritin für Tumorpatienten ergibt sich durch die Arbeiten von Papenhausen et al (201). Die Autoren fanden durch eine einfache indirekte Immunfluoreszenztechnik eine Erhöhung der Anzahl ferritintragender Lymphozyten bei Krebspatienten mit einem mittleren Prozentsatz von 10 % im Vergleich zu 3,1 % in Kontrollseren normaler Probanden, die bei 26 Patienten mit Kopf/Nacken-Ca, 14 Patienten mit Colonkarzinom und 4 Patienten mit Lungentumoren erhoben wurden. Ebenso konnten Moroz et al (181 und 182) eine Subpopulation von Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit M. Hodgkin und Mamma-Ca isoliert, die Ferritin auf ihren Oberflächenmembran enthielten.

Tabelle 11

Erhöhungen des Serum-Ferritin-Spiegels bei Patienten mit malignen Erkrankungen

Leukämien (AML, ALL, CML)	40-95%
Morbus Hodgkin	30-70%
Non-Hodgkin-Lymphome	30-60%
Primäres Leberzellkarzinom	40-95%
Mamma-Karzinom	25-90%
Keimzelltumoren	30-60%
Bronchialkarzinom	60-80%
Pankreaskarzinom	70-80%
Gastrointestinale Karzinome	20-45%
Neuroblastom	41%
Ovarialkarzinom	67%
Urogenitalkarzinom	16%
Hypernephroides Karzinom	72%

2.5.2. LCAA-2 (Laktoferrin)

Die meisten in der vorliegenden Arbeit gegen ein ferritin-ähnliches Antigen (LCAA-1) gerichteten Antiseren (Kaninchen) (Nummer 2-6 und Nummer 12-14) zeigten im nicht-absorbierten bzw. gegen Humanserum-absorbierten Zustand eine mehr oder weniger starke immunologische Reaktion mit einem zweiten Antigen (LCAA-2) in den Immunodiffusionsuntersuchungen gegen die salinen Extrakte LCES und LCEAS und einem Teil ihrer chromatographischen Unterfraktionen. Dieses Antigen wurde als LCAA-2 bezeichnet und war in LCES 6B/II und G 200/I (Abb. 13 C, F) sowie in LCEAS 6B/II und G200/I und auch G 200/II (Abb. 13 D) nachweisbar. Im Vergleich zu LCAA-1 (Ferritin) zeigte die Präzipitationslinie einen deutlich geringeren Abstand zum entsprechenden Antigen-Reservoir und auch eine deutliche Krümmung der Präzipitationslinie in Richtung auf das Antigen-Reservoir. Dieses Verhalten sowie das eindeutige Fehlen von entsprechenden Präzipitationslinien in den niedermolekularen Gelchromatographie-Fractionen LCES G 200/II und III sowie LCEAS G 200/III (Albuminfraktion) weisen das Antigen eindeutig als mindestens so hochmolekular wie LCAA-1, wenn nicht als schwerer aus. Bei dem Versuch einer Identifizierung des Antigens LCAA-2 ergab sich eine immunologische Identitätsreaktion mit Referenz-Anti-Laktoferrin-Serum, so daß das Antigen als ein laktoferrin-ähnliches Antigen bezeichnet werden muß. Bei der weiteren Isolierung von Ferritin zeigte sich, daß mit Hilfe der Immunadsorptionssäule C 14 durch Immunadsorption von LCES- bzw. LCEAS G 200/I die an C 14 bindende Proteinfraction eine starke Anreicherung bis Isolierung von Ferritin gestattete, wohingegen in der nicht-bindenden Fraction LCAA-2 überwiegend angereichert bis isoliert wurde (Abb. 23). Immunelektrophoretisch zeigte LCAA-2 α_2 -Mobilität (Abb. 22). Eine weitere Isolierung, Reindarstellung bzw. Quantifizierung von LCAA-2 in den vorliegenden Tumorfractionen oder Patientenserum wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.

In der Zwischenzeit wurden zahlreiche Arbeiten von vielen Untersuchergruppen über die Isolierung und Bestimmung, sowie klinische Bedeutung von Laktoferrin veröffentlicht.

Laktoferrin (LF) ist ein rotes eisenbindendes Glykoprotein

das in vielen exokrinen Drüsen des menschlichen Körpers und in den sekundären spezifischen Granula reifer neutrophiler Granulozyten vorkommt (Malmquist et al 164). Von dort gelangt es in eine Vielzahl von biologischen Flüssigkeiten wie Kolostrum, Tränen, Speichel, Nasen- und Bronchialsekret, Urin, Samenflüssigkeit, Zervixschleim, Pankreassaft, Dünndarmsaft, Galle, Synovialflüssigkeit und das Plasma, hier nahezu ausschließlich durch Degranulation von neutrophilen Granulozyten (Harbitz et al 104), wobei der Laktoferrinspiegel in der Regel mit der Grösse des totalen Blutgranulozytenpools korreliert (Brown et al 029). Höchste Laktoferrinkonzentrationen (4 g/l) wurden in der bovinen und humanen Milch gefunden, aus der es erstmals (1939/1951) isoliert wurde (Bennett und Mohla 031).

Laktoferrin gehört zur Klasse der siderophilen Glykoproteine und hat viele physikochemische Eigenschaften einschließlich einiger Strukturhomologien mit Transferrin gemeinsam, aber besitzt keine immunologische Kreuzreaktion mit ihm. Laktoferrin hat ein Molekulargewicht um 76 000 und weist eine hohe Affinität für Eisen (und Kupfer) auf, im Gegensatz zu Transferrin auch bei niedrigem pH (Ambruso und Johnston 004). Es besteht aus einer einfachen Polypeptidkette und bildet ein symmetrisches Glykoprotein mit zwei Domänen, die jede für sich ein Fe^{+++} -Jon binden können und je eine identische Oligosaccharidseitenkette besitzen (Moguilevsky et al 177).

Mit Hilfe der Immunperoxidase-Methode konnte Laktoferrin immunhistologisch in menschlichen fetalen mononukleären Zellen (Granulozyten), in Leber, Milz, Lungen, sowie sowie mononukleären Zellen von Gefäßwänden im fetalen menschlichen Pankreas, im Thymus (Hasselsche Körperchen) und in Drüsenzellen der Lungen nachgewiesen werden (Reitamo et al 211), ferner mit der gleichen Methode in menschlichen Geweben Erwachsener in der submandibulären Drüse (seröse Granula der azinösen Zellen), in Speicheldrüsen, Drüsen von Ösophagus, Kardia, Pylorus, Hauptzellen des Magens, der Gallenblase, in nasalen und paranasalen Drüsen, Bronchialdrüsen, neutrophilen Granulozyten, Thymusepithel (Hasselsche Körperchen), distalen Tubuli und Sammelrohren der Nieren, Samenblasen, Prostataadrüsen, Uterus-Zervix-Drüsen, Hypophysen-Mittellappen, laktierender Brustdrüse und Tränen-drüse (Miyachi 176). Nach Rado et al (209) ist die Laktoferrinbio-

synthese während der Granulozytopoese im wesentlichen auf das Metamyelozytenstadium beschränkt, wobei eine Degranulation reifer polymorphnukleärer Zellen im Serum zu einer Vermehrung des Plasma-Laktoferrins führt. Damit stellt Laktoferrin einen brauchbaren Marker der Genexpression der terminalen Stadien der Leukozytenreifung dar und wird auch als feedback-regulator der Myelopoese (Inhibition eines colony-stimulierenden Faktors) und wichtiges Agens für die optimale Granulozytenfunktion in vivo angesehen. Im Zusammenhang mit entzündlichen Veränderungen wird Laktoferrin in das Phagolysosom und während der Phagozytose außerhalb der Zelle freigesetzt. Im Serum hat es eine schnelle Plasma-Umsatz-Zeit mit einer biologischen Halbwertszeit von ein bis zwei Tagen. Es spielt eine mögliche Rolle bei der Hyposiderinämie bei entzündlichen Erkrankungen, wobei LF-gebundenes Eisen an RES-Zellen mit LF-Rezeptoren weitergegeben wird. Plasma-Laktoferrin wird hauptsächlich in der Leber katabolisiert. Dort konnte es an spezifischen Bindungsstellen im RES lokalisiert werden (Retegui et al 212), die immunhistologisch als sinusoidale Zellen und Zellen in der Zentralvenenwand (endotheliale und Kupfer-Zellen) identifiziert werden konnten (Courttoy et al 042). Für die Aufnahme in der Leber sind die im humanen Laktoferrin-Moleküle vorhandenen Galaktosyl- und Fukosyl-Reste nicht wesentlich, sondern nur der Protein-Anteil, der zusammen mit anderen kationischen Proteinen wie zum Beispiel Lysozym um gemeinsame Bindungsstellen im Leber-RES konkurriert (Moguilevsky et al 177).

Die wichtigste Funktion von Laktoferrin ist seine antibakterielle Aktivität. Laktoferrin vermag im Experiment in hoher Konzentration die Granulozytenmigration direkt zu hemmen oder in niedrigerer Konzentration über eine Bindung an LF-Rezeptoren auf mononukleären Lymphozyten-Subpopulationen eine Freisetzung von Leukozyten-Migrations-Inhibitor-Faktor (LIF) zu induzieren (Oseas et al 197). Ferner führt es zu einer vermehrten Adhäsionsbereitschaft und Aggregation von polymorphnukleären Leukozyten. Nach Bennett und Davis (014) bindet LF an adhärenzte mononukleäre Zellen und Nicht-Rosetten-bildende-Zellen, wobei Zellmembran-DNA als Bindungsrezeptor wirksam wird. (Bennett et al 016). Für die antimikrobielle Abwehr ist

von Bedeutung, dass LF Eisen bindet, das nicht mehr für eindringende Mikroorganismen zur Verfügung steht. Dabei spielt es eine Rolle als Regulator einer Hydroxyl-Radikalen-Bildung (Ambruso und Johnston 004). Ferner vermag es die NK-Zellaktivität zu verstärken, eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität zu hemmen und in vitro eine primär-humorale Immunantwort zu blockieren (Birgens 018).

Die Serumkonzentration von LF ist sehr gering, so dass sie nur radio- bzw. enzymimmunologisch in EDTA-Plasma befriedigend zu bestimmen ist. Der Normbereich der Plasma-Laktoterrin-Spiegel weist je nach Autor und verwandter eigener Methode zum Teil unterschiedliche Werte auf: 400-2200 $\mu\text{g/l}$ (solid-phase-RIA, Bennett und Mohla 013), 250-750 $\mu\text{g/l}$ (IRMA, Brown et al 029), 134+/-79 $\mu\text{g/l}$ (RIA, Estevenon und Figarella 059), 190-810 $\mu\text{g/l}$ (Venge et al 240).

Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen Plasma-LF-Spiegel und der zirkulierenden Blutneutrophilenzahl bei den meisten Patienten mit Ausnahme von Patienten mit Splenomegalie (erhöhte LF-Spiegel) und nach Splenektomie (verminderte LF-Spiegel) und unter intensiver Chemotherapie bei akuter Leukämie, die zuerst mit erhöhten LF-Spiegeln vor Wiederanstieg der Neutrophilen einherging (Brown et al 089). Auch nach anderen Autoren fanden sich erhöhte LF-Plasma-Spiegel bei Patienten mit unbehandelter oder remittierender CML (Bennett und Mohla 013), bei Polyzytämia vera, bei Kindern mit Meningokokkensepsis (Gutteberg et al 098), während bei Kindern mit erhöhter Infektionsneigung (Venge et al 240), sowie bei Patienten mit schweren Infektionen und einem Mangel an spezifischen Granula der Neutrophilen (Breton-Gorius et al 027, Boxer et al 024) signifikant verminderte LF-Plasmaspiegel beobachtet wurden. Im Gegensatz zu normalen Plasmaspiegeln (Figarella et al 063) zeigten sich erhöhte LF-Spiegel im reinen Pankreas-Saft von Patienten mit chronisch-kalzifizierender Pankreatitis, während Patienten mit Pankreaskarzinom oder akuter Pankreatitis normale Werte aufwiesen (als Prozent des Gesamtproteins: $\bar{x}$ = 0,23% gegen 0,013%; Figarella et al 062). Auch nach Fedail et al (061) lagen die LF-Spiegel im Pankreassaft am höchsten bei Patienten mit chronischer Pankreatitis ($\bar{x}$ = 2310, Bereich zwischen 870-11 400 ng/ml), während sie bei Patienten

mit Pankreaskarzinom ($\bar{x}$ = 105 ng/ml, Bereich 10-387) praktisch mit den normalen Kontrollen ($\bar{x}$ = 128 ng/ml, Bereich 30-390) übereinstimmen.

Bezüglich des Vorkommens und der klinischen Bedeutung von Laktoterrin bei Tumorerkrankungen liegen bisher nur wenige Arbeiten vor. Barresi und Tuccaris (007) untersuchten immunhistologisch mit der Immunperoxidase-Methode das Vorkommen von Laktoterrin bei der benignen Hypertrophie und dem Karzinom der Prostata. Während die immunhistologischen Untersuchungen bei der benignen Hypertrophie einen negativen Befund ergaben, zeigte sich eine starke Färbung mit Anti-Laktoterrin-Serum in neoplastischen Zellen differenzierter Adenokarzinome und in ihrem endoluminalen Material, dagegen nur eine geringe Positivität in undifferenzierten Karzinomen. Caselitz et al (036) führten ebenfalls immunhistologische Untersuchungen auf Laktoterrin und Lysozym in Speicheldrüsenkarzinom durch. Von den untersuchten 52 Karzinomen zeigte sich ein deutliches Verteilungsmuster von Laktoterrin bei 5/8 Adenokarzinomen, 3/5 Zystadenokarzinomen, 2/4 adenoiden zystischen Karzinomen und 2/3 Speicheldrüsenkarzinomen. Dabei war Laktoterrin meist intrazytoplasmatisch und auch in den Sekretionsprodukten in den Lumina sowie oft mit einer gewissen Anreicherung an den apikalen Zellgrenzen sichtbar (Adenokarzinom). Positive Tumorzellen kamen manchmal vereinzelt oder in Gruppen liegend vor und waren oft zu primitiven Gängen gegliedert (Zystadenokarzinom). Insgesamt konnte Laktoterrin am stärksten in Adenokarzinomen nachgewiesen werden, weshalb die Autoren eine Bildung von Laktoterrin in den Tumorzellen selbst annahmen und Laktoterrin als Marker der glandulären oder azinären Differenzierung des Parotisdüsenorgans ansehen. Demgegenüber zeigten Tumoren, die sich von exkretorischen Gangreservezellen ableiteten sowie Plattenepithelkarzinome keine Laktoterrin-Anfärbung. Veltri et al (238), die aus löslichen und membran-löslichen Extrakten humaner Plattenepithelkarzinome der Lungen drei tumorassoziierte Antigene isolierten, identifizierten ihr TAA-3 als Laktoterrin-kreuzreagierendes Antigen. Nach ihren Untersuchungen waren TAA-2 (Ferritin) und TAA-3 mehr oder weniger lungenspezifisch im Vergleich zu TAA-1, das in einer Vielzahl von Tumorextrakten verschiedener Organe gefunden wurde.

Ferner zeigte sich bei Auftrennung des Tumorextraktes mit Hilfe der Gelfiltration (Sephadex g 150), dass TAA-1 zum Teil und alles TAA-3 in der letzten niedermolekularen Fraktion (R-3) eluiert wurden, in 50% Ammoniumsulfat löslich waren und sich damit im Gelfiltrationsverhalten deutlich von TAA-2 (Ferritin, erste Fraktion R-1, void volume) unterschieden. Dieser Befund steht in offenem Widerspruch zu dem von uns gefundenen LF-ähnlichen Antigen LCAA-2, das offensichtlich ein mindestens so grosses Molekulargewicht besitzt wie unser LCAA-1 (Ferritin, MG bei 450000). Eine mögliche Erklärung der diskrepanten Befunde ist durch die im übrigen von einigen Autoren berichtete Neigung von LF zur Komplexbildung mit anderen Proteinen (Bennett und Mohla 013), zum Beispiel mit Casein oder Albumin (Hekman 109) bzw. mit sich selbst (Bennett, Bagby, Davies 015). Nach Hekman konnte auch gefunden werden, dass das komplex gebundene LF eine andere elektrophoretische Mobilität (Gamma) als die ursprüngliche Form des Proteins (Beta) aufwies. In unserem Falle zeigte LCAA-2 eher eine α_2 -Mobilität (Immunelektrophorese). Nach den Untersuchungen von Bennett et al (015) neigt Laktoferrin, das normalerweise ein MG um 77 000 hat, in kalziumhaltigen Flüssigkeiten zur Polymerisation, wobei sich überwiegend Tetramere mit einem Gesamt-MG um 300 000 Daltons bilden. Diese Neigung wird durch EDTA-Zusatz zum Extraktionspuffer unterdrückt, so dass das in der Arbeit von Veltri et al gefundene ausschliessliche Vorkommen von TAA-3 in der niedermolekularen Form durch den bei der Extraktion verwandten EDTA-Puffer zu erklären ist. Wir benutzten in unserem Extraktionspuffer keinerlei EDTA-Zusatz, allerdings auch keinen Zusatz von Kalzium; aus dem möglichen Ca-Anfall aus zerstörtem Gewebe erklärt sich das ausschliessliche Auftreten komplexer hochmolekularer LCAA-2 (LF)-Fraktionen. Mit verschiedenen Antihumanserum-Antisera konnten wir keinerlei Hinweise auf eine Komplexbildung von LF mit anderen Serumproteinen wie zum Beispiel Albumin finden. Darüberhinaus liegt das bei uns beobachtete Laktoferrin-Komplex-Molekulargewicht mindestens im Bereich von Ferritin (450 000), also deutlich höher als das von Bennett et al beschriebene Tetramer von 300000.

Der Umstand, daß in den Tumorextrakten LCES und LCEAS wesentlich stärkere Präzipitationslinien mit Anti-Laktoferrin-Serum und den eigenen Antiseren gefunden wurde als gegen die normalen lungengewebeextrakte (NLE bzw. LCEN), weist darauf hin, daß dieses Laktoferrin sich nicht einfach aus seinem natürlichen Vorkommen in den normalen Bronchialdrüsen herleiten läßt, sondern in Übereinstimmung mit den oben berichteten tumorhistologischen Befunden eher auf eine besondere Anreicherung dieses Proteins in den Tumorzellen zurückzuführen ist. Entsprechende immunhistologische Untersuchungen wurden weder von uns durchgeführt noch von anderen Autoren bisher berichtet. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Caselitz et al (036), die bei Speicheldrüsentumoren in Plattenepithelkarzinomen keine Laktoferrin-Anfärbung fanden, bestanden unsere Tumorextrakte ausschließlich aus Plattenepithelkarzinomen.

2.5.3. LCAA-3 (CEA)

CEA wurde 1965 von Gold und Freedman als ein tumor- und organ-spezifisches Antigen des Gastrointestinaltrakts beschrieben (82). Durch die Entwicklung empfindlicher RIAs gelang sein Nachweis aber auch in Extrakten verschiedener Tumoren (zum Beispiel Mamma-, Pankreas-, Bronchial-, kolorektales Karzinom) und in einer wesentlich niedrigeren Konzentration auch in Normalgeweben (Pankreas, Kolon, Leber und anderes mehr) sowie in verschiedenen Körperflüssigkeiten, vor allem im Serum/Plasma, wobei auch bei Normalpersonen ein Basissspiegel von je nach Methode 2,5 bis 12,5 ng/ml ermittelt werden konnte, mit leicht höheren Werten bei Rauchern gegenüber Nicht-Rauchern (übersicht bei Jamerz 149). Deutlich erhöhte CEA-Serum/Plasma-Spiegel und hohe Inzidenzraten pathologischer Konzentrationen fanden sich vor allem bei kolorektalen Karzinomen (nach einer Sammelstatistik in 71%), Pankreas- (80%), Magen- (45%), Bronchial- (71%) und metastasierendem Mammakarzinom (54%), aber auch bei benignen Erkrankungen, vorwiegend von Darm, (Colitis ulcerosa und Morbus Crohn)-Pankreas (akute/chronische Pankreatitis), Leber (Hepatitis und Zirrhose) und Lunge (Emphysem und Bronchitis), insgesamt in 20-40%. Unter Berücksichtigung von Konzentrationsbereichen zeigt sich jedoch, dass die pathologischen CEA-Spiegel bei benignen Erkrankungen eher im Normbereich liegen, während deutliche CEA-Spiegelerhöhungen zum Beispiel über 10-15 ng/ml fast ausschliesslich bei Tumorerkrankungen (18-46%) zu finden sind. Ein wichtiger Unterschied zeigt sich weiterhin bei Verlaufsbestimmungen, die grundsätzlich einer einmaligen CEA-bestimmung überlegen sind: Bei benignen Erkrankungen sind die CEA-Spiegel - wenn überhaupt - nur intermittierend (zum Beispiel Hepatitis) oder konstant (Leberzirrhose) im niedrig-pathologischen Bereich erhöht und neigen zur Normalisierung mit klinischer Besserung, bei unbehandelten Tumorerkrankungen steigen die CEA-Spiegel kontinuierlich und anfangs oft exponentiell an.

Der erste Hinweis von CEA-Vorkommen im Lungentumorgewebe stammt von Sizaret und Martin aus dem Jahre 1973 (227). Die Autoren untersuchten wässrige wie Perchlorsäure-Extrakte verschiedener gepoolter Lungenkarzinome und konnten schon mit Hilfe der Immunodiffusion unter Verwendung eines monospezifischen Antiserums

gegen CEA den direkten Nachweis führen (Plattenepithel- und Adenokarzinom). In ähnlicher Weise führten Castelli et al (038) in salinen Extrakten von verschiedenen einzelnen Lungentumoren CEA-Bestimmungen durch (CEA-EIA). Sie fanden bei 30 Tumoren CEA-Konzentrationen von 5-120 ng/mg Protein bei einer mittleren Konzentration von $47,4 \pm 36,6$ ng/mg Protein im Tumor, sowie in den umgebenden Normalgeweben (2/6 cm Abstand) $7,9 \pm 2,9$ bzw. $7,4 \pm 2,4$ ng/mg Protein (signifikanter Unterschied zum Tumorgewebe, $p < 0,001$). Pascal et al untersuchten als erste immunhistologisch (203) Lungenkarzinome auf CEA. Bei Untersuchungen an 58 Proben von 48 Patienten erhielten sie positive immunhistologische Befunde in 71% von Adenokarzinomen, 75% von bronchoalveolären Karzinomen, 22% von Plattenepithelkarzinomen, 50% von undifferenzierten Karzinomen und in allen Fällen von carcinoma in situ, wobei CEA häufig ein lineares Verteilungsmuster entlang den Apices der dem Lumen zugewandten Drüsenzellen aufwies und manchmal auch granulär intrazellulär gelegen war (Immunperoxidase-methode). Diese Befunde wurden von Nishiyama et al (190) bestätigt. Diese Autoren machten Untersuchungen mit vielen Markern unter anderem in Lungentumorgewebe und fanden CEA allgemein als häufigsten Marker positiv, davon in 2/3 der untersuchten Adenokarzinome, etwa in der Hälfte von Plattenepithelkarzinomen, ein Viertel von undifferenzierten Karzinomen, insgesamt bei 16 von 35 untersuchten Fällen. Ebenso fanden Ford et al (067) bei 82% der Tumorgewebsschnitte von 105 Patienten mit Lungentumoren eine positive immunozytochemische Lokalisation von CEA, davon bei 90% von 20 Adenokarzinomen, 86 % von 55 gering differenzierten Plattenepithelkarzinomen, 73% von 22 anaplastischen Karzinomen und 63% von 8 kleinzelligen Karzinomen. Said et al (222) untersuchten Keratinproteine und CEA in Lungenkarzinomen und fanden eine starke Anfärbung von Keratinproteinen in Plattenepithelkarzinomen mit nur seltenem Nachweis in Adenokarzinomen und ein unterschiedliches Vorkommen von CEA in allen Typen von Lungenkarzinomen mit stärkster Anreicherung in Adenokarzinomen. Die Anfärbung von CEA in Adenokarzinomen war typisch zytoplasmatisch, in einigen Fällen diffus, manchmal mit Betonung der Zellperipherie, manchmal zeigte sich nur ein fokaler Nachweis in Plattenepithelkarzinomen. Auch 4/12 Fällen

mit kleinzelligen anaplastischen Karzinomen zeigten eine Anfärbung und ebenso 9/13 Fällen mit großzelligem Karzinom, Goslin und Mitarbeiter (086) untersuchten bei 48 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom den Zusammenhang zwischen CEA-Nachweis im Tumor (Immunperoxidase-Technik) und Plasma (Roche-Test). Sie fanden eine enge Korrelation zwischen einer positiven CEA-Gewebefärbung und pathologischen Plasma-CEA-Spiegeln (18/21 CEA-gewebspositiven gegenüber nur 3/27 CEA-gewebsnegativen Fällen) und bei CEA-Gewebspositiven Patienten eine höhere Inzidenz von ausgedehnten Erkrankungen (62% gegenüber 18%) und Lebermetastasierung (43% gegenüber 7%).

Den direkten Nachweis der Bildung und Abgabe von CEA durch Lungentumoren erbrachten Ellison et al (057), die die Abgabe von CEA aus einer Bronchialkarzinomzelllinie (BEN) in das Kulturmedium verfolgten über mehr als 80 in-vitro-Passagen. Es zeigte sich, daß die Menge des freigesetzten CEA proportional zur Zahl der Tumorzellen in der Kultur war (10^5 Zellen entsprechen 30 ng CEA). Auch konnte eine direkte Proportionalität zwischen der Tumordopplungszeit in Tagen und der produzierten CEA-Menge pro Zelle, pro Tag errechnet werden ($r = 0,999$, $p < 0,0001$). Der Ausschuß an CEA variierte mit den Umgebungsbedingungen, so daß, je schneller sich die Zellen teilten, umso mehr die CEA-Bildung abnahm. Eine letale oder subletale toxische Beeinflussung führte zur sofortigen Freisetzung von CEA.

Der Nachweis von CEA in Tumorgewebeextrakten und seine höhere Anreicherung in Perchlorsäure-Extrakten, wie er in der vorliegenden Dissertationsarbeit gefunden wurde, stimmt mit den Befunden anderer Autoren gut überein. Für die Präparation von CEA aus Tumorgewebe und/oder Körperflüssigkeiten wie Pleuraexsudat wird von den meisten Autoren als erster Schritt die Perchlorsäure-Extraktion (Gesamtmolarität im Extrakt 0,6 bis 1,0 m) angegeben (CEA-Übersichtsarbeit von Lamerz 149). In der vorliegenden Arbeit wurde eine leicht modifizierte Extraktionsmethode von Krupay et al (145) verwandt. Das so extrahierte CEA wurde nach einer Voranreicherung mittels Gelfiltration an Sephadex G 200 durch die Verwendung einer Immunadsorptionssäule (CNBr.-aktiv. Sepharose 4B mit angekoppeltem Anti-CEA-IgG vom Kaninchen) isoliert. Das isolierte hochgereinigte Bronchialkarzinom-CEA (CEA-BC), das als Ausgangsmaterial für eine Radiojod-

markierung, Immunisierung zur Herstellung eines monospezifischen Antiserums und den Aufbau eines CEA-RIA als Doppel-Antikörper-test diente, zeigte beim Vergleich im Immunodiffusionstest mit anderen Referenz-Organ-CEA-Präparationen aus Mamma-, Pankreas-, Colon- und Ovarial-Karzinom und unter Verwendung verschiedener Anti-Organ-CEA-Antiseren eine immunologische Identitätsreaktion mit gegenseitiger vollständiger Absorption (siehe auch Arbeit Lamerz und Burtin 151). Dieser Befund stimmt mit den Daten von De Young und Ashman (150) überein. Diese Autoren benutzten in ihren Vergleichsstudien jedoch nur ein Antiserum gegen Colon-CEA, so dass sie bezüglich des Antiserums nur einen Ein-Weg-Vergleich anstellten. Beim Vergleich der Antikörperbindungskurven gegen Referenz-Colon-CEA- und CEA-BC-Tracer zeigte sowohl das Anti-CEA-CO-Antiserum als auch das Anti-CEA-BC-Antiserum gegen CEA-CO-Tracer ein gut vergleichbares Bindungsverhalten, ferner auch gegenüber Tracer CEA-BC. Beim Austausch der verschiedenen Tracer, organunterschiedlichen Standards und Antiseren ergab sich der geringste Unterschied beim Austausch verschiedener Standards (CEA-CO, CEA-BC), ein etwas grösserer Unterschied für die Antiseren und der grösste Unterschied für die Tracer. Die grösseren Differenzen bei Verwendung zweier Tracer erklären sich aus den schädigenden Einflüssen bei der Radiojod-Markierung durch Radioaktivität als auch durch den Einfluss des Oxidationsmittels (Chloramin T). Bei der nachfolgenden Testung des Referenz-CEA-CO- und CEA-BC-RIA-Systems gegenüber verschiedenen Kollektiven unterschiedlicher Tumorentengruppen zeigten sich für die erhaltenen Befunden keine signifikanten Unterschiede (Mamma-, gastrointestinales, Pankreas-, Bronchial-Karzinom, Malignom von unbekanntem Ursprung): Bei 119 Fällen wurde ein Spearman'scher Korrelationskoeffizient von $r_s = 0,969$ ($p < 0,001$) gefunden. Dieser Befund spricht dafür, dass bei Verwendung von monospezifischen polyklonalen Anti-CEA-Seren unabhängig von den verwendeten CEA-RIA-Systemen keine signifikant unterschiedlichen Befunde bezüglich der CEA-Spiegel im Serum und anderen Körperflüssigkeiten zu erwarten sind. Andere Untersucher haben bisher keine vergleichbare Untersuchungsanordnung verwandt. Lediglich bezüglich einer Ovarialkarzinom-CEA-Präparation aus Aszites konnten Hill et al (112)

eine immunologische Identitätsreaktion zum Colon-CEA mittels eines Anti-CEA-CO-Serums in der Immunodiffusion nachweisen. Bei dem von Santen et al (23) postulierten antigenetischen Unterschied zwischen Mammakarzinom-CEA und Colon-CEA auf Grund von differenten Messungen mittels eines Anti-Mammakarzinom-CEA-Antiserums in der Radio-Raketen-Immunodiffusion (eindimensionale Laurell-Elektrophorese) bestehen erhebliche Zweifel an der Reinheit der in den Abbildungen dargestellten CEA-Präparationen und der Verdacht einer Verunreinigung durch das kreuzreagierende unspezifische Antigen (NCA), was allein die beschriebenen Unterschiede erklären könnte.

Nach einer grösseren Sammelstatistik (Jamerz 149,) ergibt sich bei Serum/Plasma-CEA-Bestimmungen bei Patienten mit Bronchialkarzinom eine Inzidenzrate pathologischer CEA-Konzentrationen von 74% (N=854), wobei unter Berücksichtigung verschiedener Konzentrationsbereiche (Normgrenze bei 2,5 ng/ml, N=661) und gleicher Bestimmungsmethode (Roche-Test) 22% der Spiegel im Normbereich gelegen waren, je 23% im Bereich zwischen 2,5 und 5 ng/ml bzw. zwischen 5,1 und 10 ng/ml und 32% über 10 ng/ml. Im Vergleich dazu lagen bei einem Normalkollektiv von Nichtrauchern nur 3% im pathologischen Bereich (N=892) bzw. in einem Kollektiv von Rauchern (N=620) 19%. Ferner wurden von mehreren Autoren erhöhte CEA-Spiegel bei benignen Lungenerkrankungen, vor allem beim Lungenemphysem (N=90) mitgeteilt, wobei 63% im Normbereich, ein Viertel im Bereich bis 5 ng/ml, 10% bis 10 ng/ml und nur 2% über 10 ng/ml gefunden wurden. In Tabelle 12 ist eine Zusammenstellung der Inzidenzraten prätherapeutischer CEA-Spiegel im Serum/Plasma von Patienten mit verschiedenen Bronchialkarzinomen wiedergegeben. Aus dieser Zusammenstellung ist zu entnehmen, dass die Positivitätsraten für das Plattenepithelkarzinom im Bereich zwischen 37 und 82%, im Mittel bei 51%, für das kleinzellige Karzinom zwischen 23 und 80% (Mittelwert 54%), für das Adenokarzinom zwischen 24 und 86% ($\bar{x}$ = 67%), für das anaplastische Karzinom zwischen 31 und 67% ($\bar{x}$ = 39%), für das grosszellige Karzinom zwischen 51 und 100% ($\bar{x}$ = 61%), sowie für andere Karzinome zwischen 29 und 60% ($\bar{x}$ = 46%) lagen (N=1553). Nach dieser Zusammenstellung konnte eine höhere Inzidenzrate von im Mittel 67% bei Adenokarzinomen gefunden werden, während die Mittelraten beim Plattenepithel-, kleinzelligem und auch

großzelligem Karzinom zwischen 50 und 60% und am niedrigsten beim anaplastischen Karzinom und anderen Bronchialkarzinomen mit etwa 40% lagen. Diese Angaben stimmen im wesentlichen mit den bei uns gefundenen Positivitätsraten (Tab. 12, untere Zeile) überein.

Darüberhinaus konnte eine eindeutige Korrelation der Höhe und Häufigkeit pathologischer CEA-Spiegel mit dem Ausbreitungsgrad des Lungenkarzinoms gezeigt werden. So fanden sich erhöhte CEA-Spiegel über 40 $\mu\text{g/l}$ bei 12% von Patienten mit lokalisierter Erkrankung gegenüber 23% von Patienten extrathorakaler Ausbreitung (Burt et al 032). Nach Krauss et al (144) lagen bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom und "limited disease" in 47%, bei Patienten mit "extensive disease" jedoch in 80% der Fälle erhöhte Spiegel vor (N=34/26). Nach Gropp und Mitarbeitern (095) fanden sich bei 80 Patienten mit verschiedenen Bronchialkarzinomen ohne Metastasen nur in 16% erhöhte CEA-Serumwerte über 10 ng/ml gegenüber 82% pathologischer Werte bei 91 Patienten mit Metastasen. Auch nach Waalkes et al (246) lagen CEA-Spiegel-Erhöhrungen über 2,5 ng/ml bei 50% von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom und "limited disease" gegenüber 75% von 28 Patienten mit "extensive disease" vor. In der gleichen Diagnosegruppe beschrieb Lokich (158) im "limited disease"-Stadium CEA-Spiegelerhöhungen über 2,5 ng/ml bei 59% (N=29) gegenüber 72% (N=32) von Patienten mit "extensive disease". Dabei zeigte sich kein wesentlicher Unterschied bei Patienten mit Metastasen zwischen der Gruppe mit Lebermetastasen (72%) gegenüber der mit Knochenmetastasen (69%; N=14/13). Ebenso fanden Goslin et al (086) bei 85 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom CEA-Spiegel-Erhöhrungen bei Patienten mit "limited disease" in 45% der Fälle gegenüber 82% mit "extensive disease". Davon zeigten Patienten mit CEA-Spiegeln über 50 ng/ml einen Leberbefall. Unter Berücksichtigung von klinischen Stadien ergab sich nach Rasmuson et al (210) ein Anstieg der Prozentsätze pathologischer CEA-Spiegel im Serum von Stadium I mit 14% (N=22), über Stadium II mit 27% (N=102) nach Stadium III mit 50% (N=44). Nach Paone et al (200) stieg die Verteilung pathologischer CEA-Spiegel (über 10 ng/ml) von Stadium I (T1 NO MO, N=20) von 40% über 58,5% (Stadium II: T1 N1 MO, T2 NO MO, T2 N1 MO, N=53) und 85,2% (Stadium III: T3 NO MO,

T3 N1 MO, T3 N2 MO, N=81) nach 92,3% (Stadium IV: M1, N=26) an. Unsere entsprechenden Werte (über 3 ng/ml) lagen mit 30% (Stadium I), 40% (Stadium II), 63% (Stadium III) und 72% (Stadium IV) etwas niedriger, jedoch im vergleichbaren Rahmen. Die Werte über 10 ng/ml nahmen von 0% über 8%, 21% nach 39% ständig zu. Bei statistischer Prüfung bestanden signifikante Unterschiede zwischen den CEA-Werten der Gruppen I und II und der Gruppe IV sowie zwischen den vereinigten Gruppen I und II und den Gruppen III und IV ($p = 0,001$). Unser Vergleichskollektiv von 25 Fällen mit benignen Lungenerkrankungen zeigte CEA-Spiegel im Normbereich bzw. bis unter 5 ng/ml mit einem Mittelwert von $2,6 \pm 1,2$ ng/ml. Hier fanden Paone et al (200) in ihrem Vergleichskollektiv $6,45 \pm 0,83$ ng/ml. Auch Pauwels und van der Straeten (205) untersuchten Plasma-CEA-Spiegel bei Patienten mit Bronchialkarzinom und chronischer Bronchitis (Roche-Test, 2,5 ng/ml Grenzwert) und fanden gegenüber 80% pathologischer CEA-Werte bei 49 Patienten mit Bronchialkarzinom in 68% von 25 Patienten mit akuter Exazerbation einer chronischen Bronchitis ebenfalls erhöhte Werte bis unter 15 ng/ml.

Die wichtigste Indikation zur CEA-Serumspiegel-Bestimmung beim Bronchialkarzinom ist die Therapie- und Verlaufskontrolle mit Hilfe serieller Verlaufsbestimmungen. Hier konnten an einer der größten untersuchten Patientengruppen von 682 Patienten mit Bronchialkarzinom Vincent et al (242) zeigen, daß vermeintlich kurativ operierte Patienten mit einer Überlebenszeit von mehr als 15 Monaten nach Operation (N=49) über eine Beobachtungszeit von bis zu 50 Monaten nur einen mittleren medianen präoperativen CEA-Spiegel von 1,4 ng/ml aufwiesen, während eine zweite Gruppe von Patienten mit fortschreitender Erkrankung (N=81) einen präoperativen CEA-Spiegel-Median von 4,2 ng/ml aufwiesen. Während in der ersten Gruppe die Medianwerte in der postoperativen Beobachtungszeit niemals einen Wert von 1,5 ng/ml überstiegen, kam es in der zweiten Gruppe schon zu einem Übersteigen der Medianwerte über 5 ng/ml ab dem 9. postoperativen Monat. Durch diese Befunde bestätigt kommt deshalb bereits dem präoperativen initialen CEA-Wert auch eine prognostische Bedeutung zu. An Überlebenskurven konnte die Arbeitsgruppe von Vincent zeigen, daß 82% von Patienten, die mehr als 24 Monate lebten und ohne Erkrankung waren, einen initialen präoperati-

von CEA-Wert von weniger als 5 ng/ml aufwiesen. Bei Patienten mit präoperativen CEA-Werten unter 2,5 ng/ml betrug die mediane Überlebenszeit 34 Monate und das mediane erkrankungsfreie Intervall mehr als 30 Monate. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Patienten mit einem initialen CEA-Wert von über 5 ng/ml eine mediane Überlebenszeit und ein medianes erkrankungsfreies Intervall von weniger als 9 Monaten. Diese Befunde wurden im wesentlichen auch von anderen Untersuchergruppen bestätigt (Gropp et al 095, Waalkes et al 246, Ford et al 064, Paone et al 200, Lokich 158, Concannon et al 081). In dem Kollektiv von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom von Goslin et al (085) zeigten alle Patienten mit prätherapeutischen CEA-Werten über 5 ng/ml bei Ansprechen der Behandlung (Chemotherapie) einen Abfall der Werte und einen CEA-Spiegelanstieg bei Therapieresistenz. Zusätzlich zeigten bei 10 von 21 Patienten mit prätherapeutischen CEA-Spiegeln unter 5 ng/ml erneute CEA-Erhöhungen den Beginn eines Rezidivs an. Nach den Untersuchungen von Woo et al (260), die Serumbestimmungen von CEA und drei Kohlenhydraten (Fruktose, Mannose, Galaktose) in ein seriell-multiples Regressionsmodell einfügten, zeigte sich, daß serielle CEA-Bestimmungen über 5 ng/ml signifikant mit dem Erkrankungsverlauf (Bronchialkarzinom) korreliert waren, wohingegen serielle CEA-Spiegel unter 5 ng/ml mehr den Trend zu Veränderungen im Erkrankungsverlauf wiedergeben. Auch nach Dent et al (047) ist die CEA-Bestimmung von hohem prädiktiven Wert für den Erkrankungsverlauf beim Bronchialkarzinom. Die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit prätherapeutischen normalen CEA-Spiegeln und normalen C1q-Bindungsaktivitäten (Fehlen von Immunkomplexen) lag mit 18 Monaten signifikant über der von Patienten mit erhöhten CEA-Spiegeln unabhängig vom Immunkomplexstatus (um 5 Monate).

Die Bedeutung von CEA-Bestimmungen für die Therapie- und Verlaufsbeurteilung von Patienten mit Bronchialkarzinom zeigt sich auch bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kurzzeitverläufen von 24 operablen und 6 inoperablen Patienten. 15 der 24 operablen Patienten wiesen präoperativ normale CEA-Spiegel auf. Bei 8 der 9 Patienten mit präoperativ erhöhten Werten kam es post-operativ zu einem CEA-Spiegelabfall bis teilweise in den Normbereich. Ein Patient mit dauernd erhöhtem CEA-Wert verstarb, bei zwei Patienten mit präoperativ normalem Wert kam es nach 5 bzw.

30 Wochen zu einem Spiegelanstieg mit zu sichernder Fernmetastasierung. Von den 6 inoperablen Patienten (Stadium IV) wiesen 5 pathologische Spiegel mit weiterem Anstieg im Verlauf auf; bei dem Patienten mit initial normalem CEA-Wert kam es später zu einem mässigen Anstieg auf 12 ng/ml. Für eine Berechnung von mittleren Überlebenszeiten reichen Anzahl und Beobachtungszeit nicht aus. Anschließend sei erwähnt, daß beim Bronchialkarzinom zur Verbesserung der Aussagekraft von CEA-Serumwerten, vor allem im Hinblick auf falsch-positive Ergebnisse bei Patienten mit benignen Lungenerkrankungen, auch zusätzlich oder alleinige CEA-Bestimmungen in der Bronchialflüssigkeit (Bronchiallavage)(020) durchgeführt wurden. Von Blair und Goldberg wurde CEA bei 90 Probanden im Sputum (1-3 ml) sowie in Bronchiallavageflüssigkeit (BLF) bestimmt. Dabei ergaben sich im Bronchiallavage-Aspirat CEA-Werte von 20-1400 ng/ml. Patienten ohne Bronchialkarzinom zeigten dabei in über 70% CEA-Werte bis 300 ng/ml, Fälle mit Bronchialkarzinom in knapp über 50% erhöhte Werte über 300 ng/ml. Le Marie et al (153) bestimmten CEA-Spiegel im Serum und in der BLF (150 ml Kochsalzlösung, physiologisch) bei 81 Patienten. Als Grenzwert (CEA-EIA der Fa. Abbott) ergab sich im Serum ein Wert von 5 ng/ml, in der BLF von 10 ng/ml. Bei 12 Normalfällen lagen sämtliche Werte in der BLF kleiner 10 ng/ml, bei Fällen mit Entzündungen waren sie in 6% (N=31) erhöht, bei Fällen mit Bronchialkarzinom in 61% (N=28), bei Fällen mit metastasierenden Lungentumoren in 60% (N=10). Die entsprechenden Plasmakonzentrationen waren zu 3%, 29% und 30% erhöht. Merrill (174) und Mitarbeiter untersuchten CEA-Spiegel in der BLF von Rauchern und Nichtrauchern (200 ml Kochsalzlösung). Sie fanden bei Nichtrauchern (N=24) 42 +/- 19 ng/mg Protein gegenüber 76 +/- 51 ng/mg Protein bei Rauchern (N=28). Diese Relativ-Werte lagen viel höher als entsprechende Plasma-CEA-Spiegel im Verhältnis zum Gesamteiweiss (0,04 +/- 0,02 ng/ml Protein/0,08 +/- 0,05 ng/mg Protein). Canivet et al (034) führten CEA-Bestimmungen im Bronchialsaft und Serum von 39 Patienten mit nicht-malignen Lungenerkrankungen (Bronchitis, Tuberkulose, Raucher und Nichtraucher), bei 50 Patienten mit metastatischem Lungenbefall und 134 Patienten mit Bronchialkarzinom verschiedener histologischer Typen durch (BLF mit 10 ml Kochsalzlösung, Roche-Test). In der ersten Gruppe fanden sich bei Nichtrauchern im Bronchialsekret meist

Werte unter 10, bei Rauchern bis über 50 ng/mg Protein, im Serum bei Nichtrauchern Werte bis 10 und Rauchern Werte meist bis 20 ng/ml. Bei Patienten mit pulmonalen Metastasen lagen die meisten CEA-Spiegel im Bronchialsekret bis 50 ng/mg Protein mit einem Mittelwert im Bereich von 8 ng/mg Protein; noch höhere Werte ergaben sich bei Patienten mit primären Lungenkarzinomen mit einem Mittelwert knapp unter 25 ng/mg Protein. Die Serum-CEA-Spiegel waren bei metastatischem Lungenbefall höher als bei nicht-malignen Erkrankungen oder primärem Lungenkarzinombefall. Der Quotient aus Bronchialsekret-CEA und Serum-CEA führte zu einer besseren Diskriminanz zwischen metastatischem und primärem Lungenbefall: Bei metastatischem Befall lag der Mittelwert des Quotienten um 0,6 gegenüber einem signifikant höheren Wert von 3,3 beim Bronchialkarzinom.

Autor, Land Jahr	Grenz- wert	Platten- epithel	klein- zellig	Adeno- stisch	anapla- stisch	groß- zellig	andere	Gesamt	Lit
Lo Gerfo et al USA, 1972	2,5	79% (38)	73% (11)	50% (10)	0/1		60% (5)	71% (65)	(157)
Vincent et al USA, 1979	2,5	40% (130)	49% (130)	68% (199)		51% (94)	46% (65)	52% (682)	(243)
McKenzie et al U.K. 1977	20	37% (48)	31% (32)	75% (8)	42% (12)		29% (7)	38% (107)	(170)
Ford et al U.K. 1977	15	38% (151)	23% (13)	78% (27)	31% (29)			41% (220)	(064)
Burt et al U.K. 1978	20	61% (28)	60% (15)	2/2	67% (9)			63% (54)	(032)
Gropp et al FRG, 1979	10	82% (34)	80% (20)			100% (15)		86% (69)	(095)
Paone et al U.K. 1980	10	67% (96)	69% (35)	86% (22)		74% (27)		71% (180)	(200)
Krauss et al USA, 1981	3	61% (18)	62% (60)	24% (19)		64% (11)		56% (108)	(144)
Vorliegende Arbeit	3	65% (37)	50% (18)	54% (13)				59% (68)	
Summe		51% (644)	54% (334)	67% (300)	39% (51)	61% (147)	46% (77)	55% (1553)	

Tabelle 12 CEA-Serumspiegel bei Patienten mit Bronchialkarzinom, Positivitätsraten (N)

2.5.4. LCAA-4 (NCA)

Wie unter 2.4.4.4 beschrieben, konnte mit Antiserum Nr. 15 (Abb. 24) in der Immunodiffusion gegen LCEP, LCES, LCEAS neben einer kräftigen Präzipitationslinie in der Nähe des Antigen-Reservoirs eine schwächere Linie in Nähe des Antikörper-Reservoirs gegen diese Extrakte nachgewiesen werden, die mehr in den niedermolekularen Fraktionen zu finden war und deshalb einem Antigen im Molekulargewichtsbereich 10^5 entsprach. Mit einem Anti-NCA-Referenzserum zeigte sich eine identische immunologische Reaktion, so daß das Antigen als NCA identifiziert werden konnte. Mit einem hochspezifischen Referenz-Anti-NCA-Serum (Nr. 43, Abb. 32) zeigte sich, daß NCA nicht nur in LCEP II sowie im Perchlorsäureextrakt von normaler Lunge (LE), sondern auch in der niedermolekularen Fraktion des Pleuraexsudat-Extraktes eines Patienten mit Lungenkarzinom vorhanden war. Mit Hilfe von Immunadsorption konnte dieses NCA gereinigt werden, wurde jedoch nicht weiter für radioimmunologische Untersuchungen wegen seines ubiquitären Vorkommens vor allem in normalen Lungengeweben (LE, NLE, LCEN) verwandt.

Der Nachweis von NCA in normalem und karzinomatösem Lungengewebe wirft die Frage nach den mit CEA kreuzreagierenden Antigenen auf. NCA (nonspecific crossreacting antigen) ist das erste und bedeutendste mit CEA kreuzreagierende Antigen. Es wurde erstmals 1972 von v.Kleist et al (136) sowie gleichzeitig als NGP (normal glycoprotein) von Mach und Pustaszeri (161) beschrieben. Weitere Synonyma dieses Antigens -aufgrund der Beschreibung und nachträglicher Identifizierung- sind CEX, CCEA-2, CCA-III, β_2 und auch TEX, wobei NCA (besser NCA-1) der heute gebräuchlichste Name ist (Übersicht bei 215, 103, 139, 033).

NCA-1 kommt vorwiegend in salinen und Perchlorsäure-Extrakten verschiedener menschlicher Tumoren und Normalgewebe (Hauptsächlich Milz, Lunge, Kolon) vor, ferner in Zellen der myeloischen Reihe (Granulozyten, Monozyten, Neutrophile), im Serum von Gesunden sowie Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen. Eine Kreuzreaktion polyklonaler Anti-CEA-Seren mit NCA läßt sich deshalb am besten durch Absorption mit Perchlorsäure-Extrakten von normaler Lunge oder Milz entfernen. NCA-1 weist wie CEA elektrophoretisch β -Mobilität auf, aber ein niedrigeres Mo-

lekulargewicht (50 000-60 000) mit einem niedrigeren Sedimentationskoeffizienten (3,8 s), einem geringeren Kohlenhydratgehalt (30-35%, Fukose, Hexose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactose, N-Acetylneuraminsäure), eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung wie CEA (zusätzlich Methionin) und eine weitgehend identische Aminosäuresequenz der ersten 24 aminoterminalen Aminosäuren bis auf den Austausch von Valin (CEA) gegen Alanin in Position 21 (Rogers 215, Hammarström 103, Engvall 058). Das von Kessler et al (133) beschriebene TEX ist dem NCA-1 sehr ähnlich und immunologisch identisch (MG um 110 000, 35% Kohlenhydrate). Neben den mit CEA-Determinanten identischen kreuzreagierenden Determinanten besitzt NCA noch mindestens eine spezifische Antigen-determinante, so daß ein polyklonales Anti-NCA-Serum durch Absorption mit CEA spezifisch gemacht werden kann. NCA-1 läßt sich immunfluoreszenzoptisch bzw. durch Immunperoxidasetechnik in Normal- und Tumorgewebe von Lunge, Magen, Kolon in Verbindung mit der Zellmembran nachweisen. Wie CEA kommt NCA auch in fetalen Organen vor (Gadler 073), wobei höchste Konzentrationen in Kolon, Leber, Milz und Plazenta gefunden wurden. In kolorektalen und Magenkarzinomen weist NCA eine etwa gleiche Lokalisation wie CEA auf (assoziiert mit der Membran, am apikalen Pol der epithelialen Zellen), manchmal auch als Färbung der Interzellularwand, in normalen Lungenschnitten vor allem in der Alveolarwand (alveoläre Makrophagen), in Milzschnitten in polymorphzelligen Leukozyten (Monozyten, Neutrophile und Basophile; 033). Besondere Bedeutung kommt dem Nachweis von NCA im Zytoplasma von normalen und neoplastischen neutrophilen Granulozyten, Myelozyten, Metamyelozyten, Makrophagen und Monozyten zu, weshalb es auch als normales myeloisches Differenzierungsantigen angesehen wird (Pattengale et al 204). Auch bei Gesunden konnten NCA-Serumspiegel gefunden werden, die auf die Sekretion von NCA aus myeloischen Zellen zurückgeführt werden; die obere Normgrenze liegt nach den meisten Untersuchern bei 100-150 ng/ml und macht damit etwa das 30-50 fache des CEA-Spiegels im Serum aus. Höhere Konzentrationen ($\bar{x}$ =164 ng/ml gegenüber 130 ng/ml bei gesunden Erwachsenen) wurden für Neugeborene beschrieben (Kleist et al 137).

Bei Patienten mit benignen Erkrankungen (Lunge, Colitis ulcerosa, Leber, Pankreas) wurden in einem hohen Prozentsatz erhöhte

NCA-Serumspiegel beobachtet (v.Kleist 139). Bei Patienten mit Tumorerkrankungen wurden zum Teil ebenfalls erhöhte NCA-Spiegel gemessen, die jedoch nach den Erstuntersuchern weder mit dem CEA-Spiegel noch mit der Tumorausbreitung oder dem Krankheitsverlauf signifikant korrelierten. Deswegen wurde der Nutzen von NCA als Tumormarker verneint. Diese strikte Ablehnung von NCA als Tumormarker hat jedoch in den letzten Jahren eine gewisse Korrektur erfahren. Vor allem kommt dem NCA als Marker bei der CML eine Bedeutung zu. Frenoy und Burtin (170) fanden gegenüber einem Normalkollektiv ($\bar{x}=37,8 \pm 14,6$ ng/ml) erhöhte NCA-Spiegel im Serum bei Patienten mit CML ($\bar{x}=98,6 \pm 71,7$ ng/ml), während Patienten mit AML ($\bar{x}=24,6 \pm 10,4$ ng/ml) niedrigere Konzentrationen aufwiesen. Von den CML-Patienten zeigten solche mit aktiver Erkrankung höhere NCA-Spiegel als solche in einer Blastenkrise. Es liess sich eine bessere Korrelation zwischen dem NCA-Spiegel und der Anzahl reifender myeloischer Zellen als zur Gesamtzahl der polymorphzelligen Leukozyten finden (171 Frenoy). Neben dem NCA-Zellgehalt wurde die Rate der NCA-Freisetzung aus den myeloischen Zellen als wesentlicher Faktor für die Regulation des NCA-Serumspiegels angesehen. Auch Wahren et al (248) wiesen NCA in hoher Konzentration in neutrophilen Granulozyten (0,05-0,2 pg/Zelle), ferner in Myelozyten und Metamyelozyten nach. Im Serum von Patienten mit CML zeigten sich höhere Spiegel ($\bar{x}=262$ ng/ml) als bei nicht leukämischen Personen (51 ng/ml) oder Patienten mit AML (55 ng/ml). In einer grösseren Studie der gleichen Arbeitsgruppe (249) zeigten sich gegenüber einem Normalkollektiv ($\bar{x}=71$ ng/ml) deutliche NCA-Spiegelerhöhungen bei unbehandelten CML-Patienten (732 ng/ml), niedrigere Werte bei schlecht (421 ng/ml) bzw. gut (160 ng/ml) kontrollierten Patienten. Dabei korrelierten die NCA-Spiegel mit der Anzahl reifender Myelozyten im Blut und dem klinischen Verlauf. In der Blastenkrise ($\bar{x}=109$ ng/ml) zeigten sich niedrigere Werte, noch niedriger lagen sie (50 ng/ml) bei Patienten mit akuter nicht-lymphoblastischer Leukämie, ohne dass dafür Anti-NCA-Antikörper verantwortlich gemacht werden konnten. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass eine enge Korrelation zwischen der Gesamtzahl peripherer Granulozyten und der Menge von NCA im lysierten Gesamtblut sowohl bei Gesunden als auch bei durch zytostatische Therapie myelo-supprimierten Patienten gefunden

wurde (Gadler 074).

Von Kleist et al (138) gelang der Nachweis von relativ hohen (1/64-grösser) Anti-NCA-Antikörpertitern im Serum von Patienten mit malignen Erkrankungen (kolorektales Karzinom, Bronchialkarzinom) mit Hilfe der passiven Hämagglutinationstechnik und damit der Nachweis von NCA als Autoantigen. Hohe Titer zeigten sich nach Tumorentfernung, kein oder ein geringerer Titer bei Metastasen oder inoperablem Tumor.

Shively et al (226) entwickelten einen spezifischen TEX (NCA)- und CEA-RIA und verglichen für beide Marker die Serumspiegel bei Tumorpatienten (Kolon-, Mamma-, Bronchial-, Kopf/Hacken-Karzinom) und Normalpersonen unter besonderer Berücksichtigung des Raucherstatus. Gegenüber CEA, dessen Serumspiegel durch den Raucherstatus nicht beeinflusst schien, stellte sich heraus, dass NCA (Normgrenze bei 200 ng/ml) in 29% bei gesunden Rauchern erhöht war. In der Patientengruppe mit Kolonkarzinom (N=38) waren CEA und NCA gleich aussagekräftig. Beim Bronchialkarzinom (N=67) war NCA (75% erhöhte Spiegel) dem CEA (57% hoch) vor allem im Frühstadium überlegen, ebenso beim Mammakarzinom (N=86, CEA bei 31% und NCA bei 53%) und beim Kopf/Hackenkarzinom (N=42, CEA bei 19% und NCA bei 67% erhöht). Auf Grund der Befunde wurde dem NCA-Test eine ebenso gute bis bessere klinische Brauchbarkeit wie dem CEA zugesprochen. Diese Befunde widersprechen jedoch allen früheren Mitteilungen und sind bisher von keiner anderen Untersuchungsgruppe nachvollzogen worden.

Kürzlich beschrieben Buchegger et al (030) neben dem NCA-1, das sie als NCA-55 (IG bei 55 000) bezeichneten, noch ein weiteres mit NCA-1 sehr eng verwandtes Antigen, das sie als NCA-95 (IG bei 95 000) benannten und das in Perchlorsäure-Extrakten der normalen Lunge und immunfluoreszenzoptisch auf der Oberfläche normaler Granulozyten nachweisbar war. Dieses Antigen soll hauptsächlich für die Reaktion mancher sogenannter spezifischer monoklonaler Anti-CEA-Antikörper mit Granulozyten verantwortlich sein, wohingegen darüberhinaus spezifische monoklonale Anti-CEA-Antikörper diese Reaktion nicht mehr aufweisen dürfen. Im Vergleich zu monoklonalen spezifischen Anti-NCA-1-Antikörpern, die immunhistologisch mit Kolonkarzinomzellen und Granulozyten, ferner mit epithelialen Zellen (Bronchial-, Alveolarepithel der Lunge, inter- und intralobuläre duktaile Epithelzellen des Pan-

kreis) reagieren, reagierte ein monoklonaler Antikörper, der HCA-95 band, nur mit Granulozyten. Nach diesen Untersuchungen soll das neue Antigen NCA-95 ausschliesslich in Granulozyten, aber nicht mehr in epithelialen Zellen vorkommen.

Abschliessend sei erwähnt, dass neben dem beschriebenen NCA-1 noch weitere mit CEA kreuzreagierende Antigene beschrieben wurden. Dazu gehören ein aus Mekonium und Stuhl extrahiertes höhermolekulares Antigen NCA-2 (MG bei 160 000-170 000, Kohlenhydrat- und Aminosäuregehalt ähnlich wie CEA), ferner ein dem CEA ebenfalls sehr ähnliches Antigen aus Stuhl (NFA-2, normal fecal antigen-2), ein ebenfalls im Stuhl nachweisbares niedermolekulares NFA-1 (MG bei 20 000-30 000, 13% Kohlenhydrate, β -Mobilität), sowie ein normal fecal crossreacting antigen NFCA, wohingegen das im Stuhl nachweisbare fäkale NCA mit dem HCA-1 aus Lunge völlig identisch sein soll (Rogers 215, Burtin 033, v. Kleist 139, Kuroki 147, Matsuoka 168, Kuroki 148).

Schliesslich sei auch das von Primus et al (208) beschriebene mit HCA-2 wahrscheinlich identische Mekonium-Antigen (α -Globulin, MG 185 000) sowie das von Svenberg et al (230) beschriebene aus der Galle extrahierbare normal biliary glycoprotein (BGPI) erwähnt (MG 90 000, 40% Kohlenhydrate). Abschliessend sei noch auf einen neuen Aspekt hingewiesen, der von der Arbeitsgruppe von Ochi et al (193) erarbeitet wurde. Diese Autoren verglichen die immunochemischen Charakteristika von CEA, HCA-1 und dem sauren α_1 -Glykoprotein (orosomukoid = AGP). Es gelang ihnen, CEA, HCA-1 durch Immunabsorption an Säulen mit angekoppeltem Anti-AGP-Antikörpern zu isolieren. Mit polyklonalen Anti-AGP-AK konnten sie nachweisen, dass einige Antiseren Antikörper gegen eine gemeinsame Antigen-Determinante auf CEA, HCA und auch AGP enthielten. Auf Grund ihrer Untersuchungen (MG von CEA 180 Tausend, HCA 60 000, AGP 40 000) vertreten die Autoren die Hypothese, dass sowohl auf Grund vom MG, Aminosäuren- und Kohlenhydratzusammensetzung der drei Glykoproteine CEA ein "Big-Big- α_1 -Glykoprotein" und HCA-1 ein "Big- α_1 -Glykoprotein" sein soll. Das beschriebene Trennverhalten und die von den Autoren aufgestellte Hypothese wurden bisher von keiner anderen Untersuchungsgruppe bestätigt.

2.5.5.1. Andere bekannte Antigene

Neben einem als ICAA-5 bezeichneten nicht-identifizierten Antigen konnte in allen untersuchten Tumor- und Normalgewebsextrakten auch α_1 -Antichymotrypsin (Achy) nachgewiesen werden. Bei diesem Antigen handelt es sich um ein Glykoprotein vom MG 68 000 (26% Kohlenhydratgehalt) mit einer α_1 -Mobilität in der Elektrophorese, das eine gewisse homologe Struktur mit dem α_1 -Proteinase-Inhibitor aufweist und im Serum gesunder Probanden in einer Konzentration zwischen 40 und 60 mg% vorkommt (Travis et al 235). Achy stellt ein akutes-Phase-Protein dar, dessen Plasmakonzentration sich nach Gewebsdefekten innerhalb von acht Stunden verdoppeln kann. Es ist damit für eine spezielle Regulation spezifischer chymotrypsin-ähnlicher Enzyme verantwortlich, wie sie bei entzündlichen Prozessen freigesetzt werden. Durch weitere Untersuchungen (Travis et al 236) konnte gezeigt werden, daß Achy stabile Komplexe mit Pankreas-Chymotrypsin, Leukozyten-Cathepsin G und Mastzell-Chymotrypsin zu bilden vermag und eine besondere Affinität für Leukozyten-Cathepsin G besitzt, wohingegen α_1 -Proteinase-Inhibitor mehr Pankreas-Chymotrypsin inaktiviert. Ein weiterer Umstand für den deutlichen Nachweis von Achy in den untersuchten Lungengewebsextrakten liegt darin begründet, daß es in besonders hoher Konzentration in der Bronchialflüssigkeit auftreten soll (Riley und Brogan 219). Da die Granula-Fractionen von neutrophilen und basophilen Leukozyten Chymotrypsin-ähnliche Enzyme enthalten, die bei entzündlichen Prozessen während der Phagozytose wirksam werden, scheint Achy eine besondere Rolle für die Kontrolle im Abbau dieser Proteinasen zu spielen. Nach den Untersuchungen von Kelly und Mitarbeitern (127) wurde dieses akute-Phasen-Protein auch zur Überwachung von Tumorpatienten eingesetzt, wobei es unspezifische Erhöhungen bei metastasierenden Karzinomen und damit eine Tumorprogression anzeigte (zum Beispiel beim Mamma-, Prostata-, Magen-, kolorektalem, Blasenkarzinom, Leukosen, Lymphome). Im Vergleich zu einigen anderen Serum- α -Globulinen wurde Achy der Vorzug wegen einer normalen Verteilung bei Gesunden und einem Mangel an phänotypischer Variation (wie zum Beispiel beim Haptoglobin) gegeben. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß auch andere akute-Phase-

Proteine beim Bronchialkarzinom als unspezifische Marker verwandt wurden, wie zum Beispiel CRP, Fibrinogen, Alpha₁-Antitrypsin (Nash 186), alpha₁-Glykoprotein (Ganz 076), alpha₂-Coeruloplasmin (Linder 155), sowie alpha₂-Makroglobulin (Briese 028) (Gropp und Luster 096).

Als weitere in Serum und anderen Körperflüssigkeiten meßbare Substanz, die beim Bronchialkarzinom als Tumormarker eine gewisse Bedeutung erlangten, seien erwähnt β_2 -Mikroglobulin (Hällgren 100) als Proliferationsprotein bzw. eine nach Inkubation bei Raumtemperatur meßbare β_2 m-modifizierende Aktivität (Nissen et al 191), ferner Plazentaproteine wie alpha₂-PAG (Gropp et al 091), Serunkohlenhydrate (Fukose, Mannose, Galaktose: Woo 260) bzw. Glykosyltransferasen (Sialyl-, Fukosyl-, Galaktosyl-Transferase: Ronquist 216, Kijimoto-Ochiai 135) sowie im Urin Polyamine (Putrescin, Spermidin, Spermin: Woo 261) und Urin-Ribonukleoside (Pseudo-Urididin, 1-Methyl-Adenosin, -Inosin, N²-Methyl-Guanosin, N²N²-Dimethyl-Guanosin: Waalkes 247), die Bestimmung von Immunkomplexen im Serum zum Beispiel mit dem C1q-Deviationstest (Gropp et al 093).

Von ganz großer Bedeutung vor allem für klein- aber auch großzellige Bronchialkarzinome ist die Untersuchung ektoptisch gebildeter Hormone im Serum, wobei die zur Hormonbildung befähigten Zellen als K- oder Kultschitzky'sche Zellen mit möglicher Abstammung von neuralen Ektoderm und einer Beziehung zum APUD-System (Amine-Precursor-Uptake- and Decarboxilation) identifiziert wurden. Zu den am häufigsten meßbaren Hormonen zählen Calcitonin, ACTH, ADH, Parathormon, HCG, β -Endorphin, alpha-MSH und seltener HGH, Prolaktin, Bombesin und andere mehr (Gropp et al 096 und 094, Winkelmann et al 258). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß bei den meisten Patienten mit serologisch nachweisbarer Erhöhung der Hormonspiegel nur selten (unter 5%) entsprechende paraneoplastische Syndrome (Hypo/Hyperkalzämie, Cushing-Syndrom, inadäquates ADH-Syndrom, Gynäkomastie) auftreten, da die Markerhormone meistens als hormoninaktive Prohormon-Vorstufen (zum Beispiel big ACTH) mit sehr viel höheren MG gebildet werden. Von möglicherweise noch größerer Bedeutung scheint beim kleinzelligen Bronchialkarzinom der Nachweis eines hirnspezifischen glykolytischen Enzyms, der neuronenspezifischen Enolase (NSE) zu sein, die im Serum von 65-73% von Pa-

tienten mit kleinzelligem und nur bei ungefähr 11% von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom erhöht gemessen werden kann (Carney et al 035).Schliesslich sei noch auf einen anderen Proliferationsmarker mit klinischer Relevanz hingewiesen, der vor allem beim kleinzelligen Bronchialkarzinom auftritt, das Tissue Polypeptide Antigen (TPA:Björklund 019).Dieses partiell mit Zytokeratinen identische Antigen (MG 41 000,Neigung zu Aggregaten,MG 287 000),ist auf der Zellmembran vieler epithelialer Tumoren und als zirkulierendes Antigen (Normgrenze zwischen 60 und 120 U/ml) mit hohen Inzidenzraten bei verschiedenen Tumorerkrankungen (Mamma-,Bronchial-,kolorektalem Karzinom, Prostata-,Blasen-,Zervix-,Ovarial-Karzinom,80-100%),aber auch bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen vorwiegend von Leber,Lunge und Urogenitaltrakt nachweisbar.Beim Bronchialkarzinom wurde für TPA bei einer Spezifität von 95% eine Sensivität von 94% bei allen Bronchialkarzinom-Typen gegenüber einer CEA-Sensivität von 81% beim nicht-kleinzelligen und von nur 64% beim kleinzelligen Bronchialkarzinom gefunden.Die kombinierte Bestimmung von TPA und CEA sowie deren formelhafte Verbindung soll ein verbessertes Diskriminanzvermögen beim Bronchialkarzinom zwischen Patienten mit und ohne aktiver sowie progressiver Erkrankung bieten (Lüthgens und Schlegel 159). Von den beiden erst seit kurzer Zeit mittels monoklonaler Antikörper entdeckten Tumormarkern CA 19-9 (vorwiegend erhöht beim Pankreaskarzinom,Magenkarzinom und hepatobiliären Karzinomen) und CA-125 (vorwiegend bei serösen Ovarialkarzinomen und Pankreaskarzinom) wurde für den ersten Marker (Ritts 213) beim Bronchialkarzinom nur eine niedrige Inzidenzrate erhöhter Spiegel von 10-15% (Del Villano 046) und für den letzteren von circa 30% (Bast 008) beschrieben,so dass diese Marker für das Bronchialkarzinom eher eine ausschliessende Bedeutung im Sinne der Abgrenzung von sekundären Lungenmetastasen besitzen. Inzwischen wurde von einigen Untersucherguppen aus einer Vielzahl gegen unterschiedliche Bronchialkarzinom-Zelllinien hergestellten monoklonalen Antikörper nach ausgedehnten sorgfältigen Austestungen nur einige wenige Antikörper mit hoher Spezifität gegen einzelne histologische BC-Typen wie Adenokarzinom (Mulshine 184),kleinzelliges BC (Bernal 017) und verschiedene Bronchialkarzinome (Rosen 217) gefunden.Diese Antikörper spie-

len jedoch bis heute nur eine Bedeutung für immunhistologische Gewebsuntersuchungen, wohingegen mit Hilfe dieser Antikörper kein lungenkarzinom-spezifisches zirkulierendes Antigen mit entsprechenden Inzidenzquoten und hoher Sensitivität und Spezifität gefunden wurde.

Eine Verbindung zwischen immunhistologischer und serologischer Tumordiagnostik stellt eine erstmals von Goldenberg et al. (083) am Menschen angewandte Untersuchungstechnik dar, die als Radioimmundetektion bzw. Radioimmunszintigraphie bezeichnet wurde. Bei dieser Methode werden mit Hilfe meist radiojodmarkierter Antikörper gegen Tumormarker immunszintigraphisch okkulte Metastasen oder Lokalrezidive aufgespürt. Diese Technik, die heute wegen geringerer Spezifitäts- und Absorptionsprobleme nach Möglichkeit mit Hilfe monoklonaler Antikörper (Ak gegen nur eine Antigen determinante = Epitop) durchgeführt werden, ist z.Zt. erst besonderen Zentren vorbehalten. Auch ist die Zahl der z.Zt. verfügbaren relevanten Antikörper noch gering, wobei die größten Erfahrungen international mit markierten Anti-CEA-Antikörpern (poly- wie monoklonal) vorliegen. Bezüglich des Bronchialkarzinoms ist erwähnenswert, daß nach den Untersuchungen von Goldenberg et al. (083) für das Bronchialkarzinom mit Hilfe polyklonaler Anti-CEA-Antikörper von der Ziege eine Sensitivität von 71% und Spezifität von 93% angegeben wurde.

2.5.5.2. Andere neue Antigene

Trotz der verfeinerten monoklonalen Antikörperteknik mit der Möglichkeit des Nachweises isolierter Antigen determinanten (Epitope) auf menschlichen Tumorzellen basieren die meisten historischen wie erst kürzlich publizierten Arbeiten über den Nachweis von Lungentumor-assoziierten neuen Antigenen auf Immunisierungen nach konventioneller polyklonaler Art (z.B. im Kaninchen, der Ziege, Schaf, Meerschweinchen). So konnten nach den ersten grundlegenden Arbeiten von Yachi et al. (263) mit einem Antiserum vom Schaf gegen humanes

Alveolarzell-Karzinom der Lunge einige Antigene mittels Immunodiffusion und Immunfluoreszenz-Technik im Serum und Gewebe von Patienten mit Alveolarzellkarzinom, Adenokarzinom und seltener bei M.Hodgkin nachgewiesen werden (Mohr et al. 179). Ebenso fanden Frost et al. (072) in salinen Bronchialkarzinom-Extrakten in 50%igem Ammoniumsulfat lösliche Antigene, gegen die Kaninchen-Antiseren nach Absorption mit Normalgewebe in der Ouchterlony-Doppeldiffusionstechnik reagierten (Adeno- und Plattenepithel-Ca; Mol.-Gew. um 40 000, stabil bei pH 4,5, hitzeresistent). Ein später von der gleichen Arbeitsgruppe (Gennings und Bagshawe 078) als lungentumor-assoziiertes Antigen LTA bezeichnetes Antigen konnte zwar weiter gereinigt und isoliert werden, zeigte jedoch enorme Schwierigkeiten bei der versuchten Markierung mit Jod-125 und anderen Tracer-Isotopen (Mol.-Gew.Bereich zwischen 40 000 und 200 000, elektrophoretische B-Mobilität), so daß bisher keine klinischen Daten über seine Bestimmung in Seren von Bronchialkarzinom-Patienten vorliegen. Ebenso beschrieben Ford und Mitarbeiter (066) immunologische Untersuchungen, die mit Ziegenantiseren gegen eine Pülle von Zellkulturen und isolierten Zellmembranen von Bronchialkarzinomzellen verschiedener histologischer Typen hergestellt worden waren, wobei die isolierten Immunglobulinfractionen gegen Adenokarzinom der Lunge eine breite Kreuzreaktivität auch mit anderen histologischen Typen ebenso wie Antiseren gegen kleinzellige Karzinome in der Immunfluoreszenz aufwiesen. Auch ausgedehnte Absorptionsstudien erbrachten keine eindeutigen Aussagen bis auf eine fragliche Tumorspezifität. Nach den Untersuchungen von Bell und Seetharam (011) konnten mit Kaninchenantiseren gegen verschiedene Lungentumore durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen neben endodermal-abgeleiteten Antigenen vor allem bei kleinzelligen Karzinomen von der Neuralleiste abgeleitete Differenzierungsantigene nachgewiesen werden, die im normalen Respirationsepithel und anderen Normalgeweben nicht auftraten. Watson et al. (254) wiesen zwei deutlich unterschiedliche Antigenkomponenten im Bronchialkarzinom mit Hilfe von Kaninchen-Antiseren, die gegen normale Lungengewebeextrakte

absorbiert waren, durch Immunodiffusion in den Tumorextrakten nach. Diese zeigten Kreuzreaktivität mit fetalem Lungengewebe und waren nicht identisch mit CEA oder AFP. Die gleiche Arbeitsgruppe (Watson et al. 253) berichtet auch über ein mit Kaninchenantiseren gegen KCl-Extrakte aus Plattenepithelkarzinom entdecktes Antigen, das mit Hilfe einer ELISA-Methode in Seren von Bronchialkarzinom-Patienten verschiedener histologischer Typen nachgewiesen werden konnte (254). Umgekehrt konnten auch im Serum von Lungenkarzinom-Patienten Antikörper gegen antigenes Material aus einer menschlichen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie beobachtet werden (Kelly 130). Viza et al. (244) entdeckten mittels Kaninchen- und Ziegenantiseren gegen Plattenepithel-Ca und anaplastische Karzinom-Extrakte unter Verwendung immunoelektrophoretischer Verfahren spezifische Antigene in den Tumorextrakten wie Patientenserum. Darunter konnte mindestens ein tumor-assoziiertes Antigen (B1) gesichert werden. Nach Yoda et al. (266) ließen sich aus primären menschlichen Lungenkarzinomen verschiedener histologischer Typen tumorspezifische charakteristische Glykolipid-Fractionen (Ceramid-Mono/Di/Trihexoside, Globoside, Hämato-side) isolieren. Kempner et al. (131) beschrieben lungen-tumor-assoziierte Antigene mit einem Molekulargewicht von 32 000, die mit Hilfe eines empfindlichen Radioimmunoassays mit Kaninchenantiseren gegen gepoolte maligne Plattenepithelkarzinome in verschiedenen Lungentumorextrakten, Fetalgewebe und Hirngewebe, einigen Colon- und Prostata-Ca und Mammakarzinom, nicht jedoch in entsprechenden Normalgeweben nachgewiesen werden konnten. Yamada et al. (264) konnten mit Meer-schweinchen-Antiseren gegen unlösliche Extrakte aus Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Lunge in der Immunodiffusion Reaktionen gegen die entsprechenden Tumore und auch gegen Seren von Patienten mit diesen Tumoren nachweisen (zellmembran-assoziierte Proteine, β -Mobilität, unlöslich in 50%igem ges. Ammonium-Sulfat-Lösung, Mol.-Gew. um 63 000). Mohapatra et al. (178) isolierten aus einer Bronchialkarzinom-Zelllinie (A549) ein Glykoprotein mit einem Mol.Gewicht von 62 000 (enthält Sialinsäure, Galactose, Mannose, N-Acetylglucosamin, Glutamin-

säure, Prolin), das sich immunologisch deutlich von einem ähnlich großen Glykoprotein bei alveolärer Proteinose unterschied und als tumorspezifisch angesehen wurde. Segal et al. (224) beschrieben ein Lungentumor-assoziiertes fetales Antigen (LTFA), das α_2/β -Mobilität, 7S-Größe, Unlöslichkeit in 50%iger ges. Ammonium-Sulfat-Lösung aufwies und pronase-empfindlich war. Erst kürzlich gelang es Kotlar (143) im Serum von Lungentumor-Patienten einen Faktor zu isolieren, der für die humorale Leukozyten-Adhärenz-Inhibition bei Lungentumor-Patienten verantwortlich sein soll (Ammoniumsulfat-präzipitierbar bei 30 - 70%, Con A-affin, Mol.Gew. 71 000, 2 Subeinheiten von 43 000 und 28 000, pI 4,5). Mittels eines Kaninchenantisera war dieser Faktor in der zweidimensionalen Laurell-Elektrophorese als Protein im Serum von Lungenkarzinom-Patienten deutlich erhöht meßbar und zeigte nur geringe Konzentrationen in Normalseren.

Nach ihrer ersten Arbeit über Lungentumor-assoziierte Antigene berichteten Veltri et al (239) über ein anderes tumor-assoziiertes Membran-Antigen aus kleinzelligen Lungenkarzinomen, das erst nach Differentialzentrifugation und Triton-X-100-Behandlung aus der Membran gelöst werden konnte und gegen das ein Kaninchen-Immunserum hergestellt werden konnte (TAMA = lung-tumor-associated membrane-antigen). TAMA zeigte ein Mol.Gew. von 200 000, ein pI von 3,0 und eine gamma-ähnliche elektrophoretische Mobilität. Es ließ sich nicht in normalen menschlichen Erwachsenen- oder Fetal-Gewebs-Extrakten nachweisen und zeigte keine Kreuzreaktion mit CEA, AFP oder β_2 -Mikroglobulin. Es war in 80% von Lungentumorextrakten nachweisbar und nicht in Mamma- oder Colonkarzinomextrakten und immunologisch durch 3M KCl- zu zerstören.

Die Reife klinischer Anwendung mit Hilfe einer empfindlichen Nachweisttechnik wie Radio- oder Enzymimmunoassay haben bisher nur 2 Lungentumor-assoziierte neue Antigene erlangt. Wolf et al. (259) isolierten aus Pleuraexsudaten von Patienten mit Plattenepithelkarzinom ein als Lungenkarzinom-Antigen LuCA beschriebenes Antigen (säurelösliches Glykoprotein, Mol.Gew.

43 000), für das sie auch einen Radioimmunoassay entwickelten. Mit diesem Test fanden sie gegenüber Normalseren (31% erhöht) pathologische Werte bei 30% von Patienten mit lokalen und 95% mit metastasierenden Plattenepithelkarzinomen, 62% von Patienten mit Adenokarzinom, 67% mit kleinzelligem Karzinom (10 bis über 5000 ng/ml). Weitere Veröffentlichungen der gleichen Arbeitsgruppe bzw. Bestätigungen anderer Untersucher sind bisher nicht bekannt geworden.

Die Arbeitsgruppe von Braatz und Mitarbeiter am National Cancer Institute der USA (026), die zunächst über ein Lungentumor-assoziiertes Antigen mit großer Kreuzreaktivität gegenüber Anti-Chymotrypsin aus Adenokarzinomen berichtete, veröffentlichte später Untersuchungen über ein weiteres als LTA (Lungentumorassoziiertes Antigen) bezeichnetes Antigen aus kleinzelligen Karzinomen (MG 150 000, 4,5S, pI 4,7), das mittels eines Radioimmunoassays bei Normalpersonen und verschiedenen Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen untersucht werden konnte (Normalpersonen $0,92 \pm 0,43$ ug/ml; oberer Normgrenzwert 1,78 ug/ml). Bei Lungentumorpatienten wurden Serum-Erhöhungen bei 60% von Patienten mit Adenokarzinomen, 42% von Plattenepithel-Karzinom, 17% von großzelligem Karzinom und 19% von kleinzelligem Karzinom - Fällen erhoben sowie bei 13% von Patienten mit anderen Tumoren und in keinem Fall mit benigner Lungenerkrankung gegenüber 2% von Normalpersonen. Ein Drittel von Patienten im Stadium I und 2/3 der Fälle mit Stadium III wiesen erhöhte Serumspiegel beim Plattenepithel- und Adenokarzinom auf. (Braatz 025) Inzwischen beschrieb die gleiche Untersuchungsgruppe auch einen leichter zu handhabenden ELISA-Test (Braatz 026, mit Ziegenantiserum). Aber auch für diesen Test liegen bisher keine größeren Studien der gleichen Arbeitsgruppe bzw. Bestätigungen anderer Untersucher vor.

Im Jahre 1979 fand eine kollaborative Studie unter Federführung der International Agency for Research on Cancer über bronchialtumor-assoziierte Antigene statt. Die Ergebnisse dieser Studie wurden inzwischen veröffentlicht (Gennings et al. 079).

Insgesamt hatten 11 internationale Arbeitsgruppen 21 Bronchialkarzinom-assoziierte Antigen-Präparationen und 19 Antiseren für vergleichende Untersuchungen eingesandt, darunter die oben beschriebenen Arbeitsgruppen von Wolf et al., Veltiel et al., Braatz/McIntire et al., Gennings et al., Nordquist et al., zusätzlich Gropp aus Marburg, Ibrahim aus Atlanta (USA) Ikeda aus Kyoto/Japan und die Arbeitsgruppe der hier dargestellten Ergebnisse. Nach den vergleichenden Studien wurden in vielen Antigen-Präparationen mehrere Antigene einschließlich von Serumproteinen-Verunreinigungen nachgewiesen, wie auch mehrere eingesandte Antiserum-Präparationen Antikörper gegen verschiedene und auch Serumproteine enthielten. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen und teilweise eingesandten Antigen-Präparationen mit dem Antigenen LCAA-1, -2, -3 wurden als ferritin-, lactoferrin-, und CEA-ähnliche Proteine bestätigt. Ein Teil der zusätzlich nachgewiesenen Serumproteinverunreinigungen im Gegensatz zu den deklarierten Antigen-Präparationen wurde auf den Umstand zurückgeführt, daß die bei den Vergleichsuntersuchungen verwandte Nachweismethode der ein- und zweidimensionalen Laurell-Immunelektrophorese eine höhere Sensitivität als die von den Untersuchungsgruppen meist verwandte Doppelimmunodiffusionstechnik aufwies. Neben einigen möglicherweise aus Versandsschwierigkeiten resultierenden unbrauchbaren Antigen- und Antikörper-Präparationen der Vergleichsstudie konnten insgesamt 5 bisher nicht-identifizierte tumor-assoziierte Antigene entdeckt werden (zusätzlich zum in einigen Antigen-Präparationen nachweisbaren CEA): 1. ein Antigen (WG) der Arbeitsgruppe von Wolf et al. (siehe RIA-Befunde); 2. ein Antigen der Arbeitsgruppe von Ibrahim; 3. ein Antigen (TS.2) der Arbeitsgruppe von Ikeda et al. (auch nachweisbar in ICEAS G200/I-C14-3/C-27-1); 4. ein Antigen (J14-LTA) der Arbeitsgruppe von Gennings et al. (auch nachweisbar in ICEAS G200/III) und 5. ein Antigen der Arbeitsgruppe von Nordquist. Während es sich bei letzterem Antigen um eine Präparation aus Alveolarzellmembran handelte und TS.2

aus gemischten Adeno-, Plattenepithel- und Großzellkarzinomen isoliert worden war, stammen die übrigen Antigene aus Plattenepithelkarzinom-Präparationen. Wie oben beschrieben, ist bisher nur für das Antigen "WG" der Arbeitsgruppe von Wolf et al. ein Radioimmunoassay mit entsprechenden klinischen Untersuchungen veröffentlicht worden (259).

Abschließend kann festgestellt werden, daß auch mit der modernen Hybridomtechnik und der Möglichkeit der Herstellung von monoklonalen Antikörpern zwar von einzelnen speziellen Laboratorien monoklonale Antikörper mit einer mehr oder weniger großen Spezifität für verschiedene histologische Bronchialkarzinom-Typen mit teilweiser Identifizierung bzw. Charakterisierung der Größe und Protein- bzw. Lipidnatur des meist oberflächengebundenen Zellmembran-Antigens erfolgte, daß jedoch für alle diese Antigene bisher kein empfindlicher Nachweistest wie RIA oder ELA entwickelt wurde, noch ein Nachweis ihres Vorkommens als zirkulierende Antigene in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten geführt wurde.

3. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Suche nach Lungentumor-assoziierten Antigenen als Ausgangsmaterial 46 gepoolte Plattenepithelkarzinom-Resektate von Patienten mit Bronchialkarzinom sowie 2 Lungennormalgewebs-Präparate (peritumorös = LCNE bzw. Autopsiematerial bei Lungenemphysem = LNE) nach Zerkleinern und Homogenisierung für die Tumorverarbeitung mit drei verschiedenen Extraktionsverfahren (saline Extraktion = LCES, KCl-Extraktion + Ammoniumsulfatfällung = LCEAS, Perchlorsäure-Extraktion = LCEP, Normalgewebsextraktion nur salin = LCNE, LNE) verarbeitet. Von den Extrakten wurden die Präzipitate nach Zentrifugation verworfen und nur die Überstände nach einer Folge von Dialyse, Konzentrierung, Entsalzung und Ultrafiltration lyophilisiert. Zusätzlich wurde von einem Pleuraexsudat eines Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Lunge und Pleuritis carcinomatosa ein Perchlorsäure-Extrakt gewonnen. Die Weiterverarbeitung der Lungengewebsextrakte geschah durch eine Sequenz von Gelfiltration mittels Sepharose 6B (Fraktion 6BI, II, Su), mit der letzten Fraktion mittels Sephadex G200 (Fr. G200/I, II, III), wiederum der letzten Fraktion mittels Sephadex G100 (Fr. G100/I, II) sowie von ausgewählten Fraktionen je nach immunologischer Vortestung mittels Affinitätschromatographie (Immunadsorption an CNBr.aktiv. Sepharose 4B mit angekoppeltem entsprechenden Antiserum-IgG-Fraktionen), wobei neben einer nicht-bindenden (CNBr./1) eine bindende Fraktion (CNBr./3) mit 3M KSCN in PBS eluiert werden konnte. Von den Gesamtextrakten und einzelnen Unterfraktionen wurden insgesamt 16 Kaninchen immunisiert, die erhaltenen Antisera nach immunologischer Prüfung mit Normalserum, A/B-Erythrozyten und teilweise mit Lungennormalgewebsextrakt absorbiert und in ausgesuchten Fällen die IgG-Fraktionen mittels DEAE-Zellulose-Anionenaustauscher-Chromatographie präpariert.

Durch immunologische Untersuchungen vorwiegend mittels der zweidimensionalen Immunodiffusion wurden mit den eigenen und

und Referenzantiseren folgende Antigene gefunden und teilweise identifiziert:

Als erstes Antigen konnte LCAA-1 (lung-cancer-associated-antigen 1) als ein ferritin-verwandtes Antigen mit einem Molekulargewicht zwischen 2×10^5 - 10^6 und einer immunoelektrophoretischen α_2 -Mobilität in LCES und LCEAS mit Anreicherung in einigen Unterfraktionen (LCES:6B/II, G200/I, LCEAS: zusätzlich in G200/II und III), nicht jedoch in LCEP mit Hilfe verschiedener Antiseren (Nr. 2, 3, 4, 5, 6, 10, 14) nachgewiesen werden. LCAA-1 konnte weiter durch Immunadsorption (CNBr. aktiv, Seph.4B mit Anti-Humanserum-IgG NR. 27) isoliert werden. Diese Präparation wurde nach der Chloramin T-Methode mit 125 Jod radiojodmarkiert als Ausgangsmaterial für die Entwicklung eines LCAA-1-(Ferritin)-Radioimmunoassays (spez. Aktivität um $10 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Als RIA wurde ein Doppelantikörpertest (1.Ak: Nr. 14 1/200 000, Bindungsaktivität 35 %, 2.Ak: Anti-Kaninchen-IgG-von der Ziege 1/15) verwandt, dessen LCAA-1-Bestimmungen mit Ferritin-Bestimmungen eines kommerziellen immunoradiometrischen Assays (Riagnost Behringwerke) gut korrelierten ($r = 0,985$, $p < 0,001$, $N = 28$, $s_{y.x} = 46,52$).

Als zweites Antigen wurde ein als LCAA-2 bezeichnetes Laktoterrin-ähnliches Antigen mittels verschiedener Antiseren (Nr. 3, 4, 5, 6) in LCES und LCEAS und einigen Unterfraktionen (6BII, G200/I) mit einem Molekulargewicht über 2×10^5 Daltons und einer immunoelektrophoretischen α_2 -Mobilität gefunden. Seine weitere Reinigung und Anreicherung war mittels Immunabsorption an oberer CNBr.-aktiv. Seph.4B mit angekoppeltem IgG von Nr. 14 möglich (in der nicht-bindenden Fraktion).

Als drittes Antigen wurde LCAA-3 = Bronchialkarzinom-CEA (CEA-BC) mittels zweier Antiseren (Nr. 15, 16) am stärksten in LCEP und nur angedeutet in LCEAS gefunden. Zur weiteren

Präparation wurde der Pleura-PCA-Extrakt verwandt und nach Gelfiltration an Sepharose 6B (Fr. III) weiter an Sephadex G200 (Fr. I) und durch nachfolgende Immunadsorption an CNBr. aktiv. Seph. 4B mit angekoppeltem Anti-CEA-IgG Nr. 18 isoliert. Nach weiterer Immunabsorption wurde LCAA-3 -C18/3 zur Radiojodmarkierung für die Entwicklung eines Radioimmunoassays verwandt (spez Akt. um $10 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). CEA-BC wies eine immunologische Identität mit CEA-Präparationen anderer Tumorgane inclusive Colonkarzinom-CEA (CEA-CO) auf; anti-CEA-BC-Serum war mit anderen CEA-Präparationen voll absorbierbar. Immunologische Vergleiche von CEA-BC- und CEA-CO-Tracern (^{125}J -CEA-BC, -CEA-CO), entsprechenden Standards und organbezogenen Antiseren zeigten keine statistischen Unterschiede bei Verwendung beider Standards, geringe Unterschiede für die beiden Antiseren und die stärksten Unterschiede bezüglich der verwendeten Tracer (Proteinschädigung durch Markierung, Oxidation/Reduktionsmittel). CEA-Serumbestimmungen mit dem CEA-BC-RIA-System an verschiedenen Tumorpatienten-Kollektiven unterschiedlicher Organtumoren zeigten im Vergleich zu den CEA-Werten des CEA-CO-RIA-Systems keine signifikanten Unterschiede und eine gute Korrelation ($r_g = 0,969$, $p < 0,001$, $N = 119$, $s_{y,x} = 91,86$).

Als viertes Antigen konnte LCAA-4 mittels eines Referenz-Antiserums als NCA (nonspecific crossreacting antigen, wichtigstes mit CEA kreuzreagierendes Antigen) mit einem Molekulargewicht unter 10^5 Daltons in allen Tumor- und Normalgewebsextrakten mit besonderer Anreicherung in LCEP und seinen Unterfraktionen G200/II, III nachgewiesen und durch Immunadsorption (CNBr. aktiv. Seph. 4B mit angekoppeltem Anti-NCA-IgG) weiter angereichert und nach Immunabsorption isoliert werden.

Als fünftes Antigen (LCAA-5) konnte ein noch nicht identifiziertes ebenfalls niedermolekulares Antigen mittels eines Referenz-Antiserums gegen normalen Colonschleimhaut-PCA-Ex-

trakt (Anti-NE) in den LCES-Fractionen und Unterfractionen (G200/II, III G100/I, II) gefunden und durch Immunadsorption (CNBr.aktiv.Seph.4B mit angekoppeltem Anti-NE-IgG) gereinigt werden. Von weiteren Antigenen wurde neben vielen Serumproteinen α_1 -Antichymotrypsin konstant in allen Extrakten nachgewiesen.

Serumbestimmungen wurden für Alpha-Fetoprotein (laborintern entwickelter Doppelantikörper-RIA, Normgrenze bei 3 ng/ml), CEA (laborintern entwickelter Doppelantikörper-RIA, Normgrenze bei 3 ng/ml) und Ferritin (kommerzieller immunoradiometrischer Assay, Riagnost Fa. Behringwerke, Normgrenze bei 200 ng/ml) bei 25 Patienten mit nicht malignen Lungenerkrankungen und bei 165 Patienten mit Bronchialkarzinom verschiedener histologischer Typen (Plattenepithel-, Adeno-, kleinzelliges, großzelliges, anaplastisches und alveoläres Ca) und Stadien (I:N = 11, II:N = 37, III:N = 19, IV:N = 98) durchgeführt.

Für Alpha-Fetoprotein lagen alle Werte bis auf eine Ausnahme (Patient mit Lebermetastasen) im Normbereich. Für CEA nahmen die Median- und 90. Perzentilwerte von Gruppe I nach IV von 2,2/6,3 ng/ml (I) signifikant nach 6,8/42,6 (IV) zu mit einer Sensitivität über 10 ng/ml von 0 (I) bis 39 % (IV) und signifikante Unterschieden zwischen dem Vergleichskollektiv und den Gruppen I, II und IV sowie zwischen Gruppe I/II und III/IV. Das Diskriminanzvermögen des CEA-Tests zwischen den beiden Sammelgruppen zeigte mittels ROC-Analyse die beste Unterscheidung bei einem Grenzwert von 6 ng/ml (pos. präd. Wert = 92 %, Prävalenz = 72 %, Sensibilität = 51 %, Spezifität 89%).

Für Ferritin nahmen die Median- /90. Perzentil-Werte wiederum von Gruppe I nach IV von 333,3/1050 ng/ml (I) nach 661,8/1850 ng/ml (IV) zu, ohne daß wegen der starken Streuungen innerhalb der Gruppen trotz deutlichen Anstiegen der Mittelwerte von I nach IV signifikante Unterschiede mit Ausnahme zum Vergleichskollektiv zu sichern gewesen wären. Die beste Diskriminanzgrenze zwischen Gruppe I/II und III/IV lag nach ROC-Analyse beim Grenz-

wert von 1000 ng/ml (pos. präd. Wert = 86%, Prävalenz = 68%, Sensitivität = 33%, Spez. = 89%). Eine multivariate Prüfung (Geschlecht, Alter, Stadium, AFP, CEA, Ferritin, N = 112) ergab signifikante Beziehungen zwischen dem klinischen Stadium und CEA sowie Ferritin (höhere Werte mit fortgeschrittenem Stadium) und zwischen Geschlecht und Ferritin (Frauen mit niedrigeren Werten).

Verlaufskontrollen zeigten für CEA bei noch operablen Patienten (N = 24) einen CEA-Spiegelabfall (N = 7) bzw. persistierende Spiegel (N = 9) sowie ansteigende Spiegel bei Patienten mit sich entwickelnder Fernmetastasierung. Bei inoperablen Patienten lagen bei 5 von 6 Fällen pathologische Spiegel vor und zeigten eine weitere Tendenz zum Anstieg. Für Ferritin fanden sich bei inoperablen Patienten (N = 12) in 2/3 der Fälle erhöhte Werte mit Überwiegender Tendenz zum kurzfristigen postoperativen Anstieg (nach 2 Wochen) und dann folgendem Spiegelabfall. Bei 4 inoperablen Patienten lagen alle Spiegel im pathologischen Bereich und wiesen eine weitere Wachstumstendenz auf. Nach den Serumuntersuchungen werden CEA und Ferritin als brauchbare zirkulierende Tumormarker mit vorwiegender klinischer Bedeutung für die Therapie- und Verlaufskontrolle ausgewiesen.

Als Einführung zu den Eigenuntersuchungen werden die Klinik des Bronchialkarzinoms, Fremduntersuchungen zur Immundiagnose und Immuntherapie sowie grundlegende Fremduntersuchungen über die in der Arbeit gefundenen und identifizierten Antigene aufgeführt. Im Diskussionsteil werden die Eigenergebnisse mit den Untersuchungsergebnissen anderer Forschergruppen verglichen und den inzwischen bekannt gewordenen neueren Untersuchungsergebnissen zum Vorkommen und der klinischen Bedeutung der einzelnen gefundenen und von anderen Untersuchergruppen zusätzlich mitgeteilten Lungentumor-assoziierten Antigene einschließlich der mittels monoklonaler Hybridomtechnik beschriebenen Antigene gegenübergestellt.

4. Literaturangaben

- 001 Addison, G.M.; Beamish, M.R.; Hales C.N.
An immunoradiometric assay for ferritin in the
serum of normal subjects and patients with iron
overload
J. Clin. Pathol. 25:326-329, 1972
- 002 Affinity chromatography, Principles and methods
Broschüre der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden.
1974
- 003 Akahonai, Y.; Takahashi, A.; Yachi, A.; Wada, T.
Electrofocusing analysis of ferritins.
W.H. Fishman/St. Sell
Onco-Developmental Gene Expressions/Acad.Press,
N.Y./S.Fr./London 1976
- 004 Ambruso, D.R.; R.B. Johnston
Lactoferrin enhances hydroxyl radical produc-
tion by human neutrophils, neutrophil particu-
late fractions and an enzymatic generating
system.
J. Clin. Invest. 67: 352-360, 1982
- 005 Anaokar, S.; P.J. Garry, J.C. Standefer
Solid-phase enzyme immunoassay for serum ferritin.
Clin.Chem. 25:1426-1431, 1979
- 006 Arosio, P.; Adelman, T.G.; Yokota, M.; Drysdale, J.W.
A comparative study of iso-ferritins in normal
and malignant tissues. p. 743-747
W.H. Fishman/St. Sell, Onco-Developmental Gene
Expression, Acad.Press Inc. N.Y.; San Francisco.
London 1976

007 Barresi, G and G. Tuccaris:

Lactoferrin in benign hypertrophy and carcinoms
of the prostatic glands.

Virchows Archiv A 403, 59 1984

008 Bast R.C.; T.J. Klug, E.St. John, E. Jeniston, J.M. Niloff
H. Lazarus, R.S. Berkowitz, T. Leavitt, C.T. Griffiths, L.
Parker, V.R. Zurawski and R.C. Knapp:

A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to
monitor the course of epithelial ovarian cancer.

New Engl. J. Med. 309(15):883-887, 1983

009 Bell, Seetharam and McDaniel, R.C.:

Endodermally derived and neural crest-derived
differentiation antigens expressed by a human
lung tumor.

J. Immunol. 116:1236, 1976

010 Bell, C.E.; Seetharam, S.:

Identification of the Schwann cell as a peri-
pheral nervous system cell possessing a
differentiation antigen expressed by a lung
tumor.

J. Immunol. 118:826, 1977

011 Bell, C.E.; S. Seetharam:

Expression of endodermally derived and neural
crest-derived differentiation antigens by human
lung and colon tumors.

Cancer 44:12-18, 1979

012 Bende, H.: Affinitäts-Chromatographie

Chemie unserer Zeit 8, 17 1974

013 Bennett, R.M.; C. Mohla:

A solid-phase radioimmunoassay for the
measurement of lactoferrin in human plasma:
Variations with age, sex and disease.
J. Lab. Clin. Med. 88, 156-166, 1976

014 Bennett, R.M. and J. Davis

Lactoferrin binding to human peripheral blood
cells: An interaction with a B-enriched population
of lymphocytes and a subpopulation of adherent
mononuclear cells.
J. Immunol. 127:1211, 1981

015 Bennett, R.M.; G.C. Bagby and J. Davis

Calcium-dependent polymerization of lactoferrin.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 101:88, 1981

016 Bennett, R.M.; J. Davis. S. Campbell and S. Portnoff

Lactoferrin binds to cell membrane DNA.
Association of surface DNA with an enriched
population of B cells and monocytes.
J. Clin. Invest. 71:611, 1983

017 Bernal, S.D. and J. A. Speak

Membrane antigen in small cell carcinoma of the
lung defined by monoclonal antibody SM 1.
Cancer Res. 44 (1): 265-270, 1984

018 Birgens, H.S.

The biological significance of lactoferrin.
Scand J. Haematol. 33, 225-230, 1984

019 Björklund, B.

Overview on TPA: specificity, immunochemistry
and biological basis.
In H. Peters (ed.) Protides Biol. Fluids, Proc.
Colloq. 31, 1983, Pergamon Press Oxford, 1984
pp. 425-430

020 Blair, O.M., D.M. Goldenberg

A correlative Study of bronchial cytology, bronchial washing carcinoembryonic antigen, and plasma carcinoembryonic antigen in the diagnosis of bronchogenic cancer.

Acta cytol. 18:510-514, 1974

021 Boddie, A.W., Holmes, E.C., Roth, J.A. et al

Inhibition of human leucocyte migration in agarose by KCL-extracts of carcinoma of the lung.

Int. J. Cancer 15:823, 1975

022 Bolton, A.E., Hunter, W.M.

The labeling of proteins to high radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent.

Biochem. J. 133, 529, 1973

023 Bolton, A.E., V. Lee-Own, R.K. McLean, G.S. Challand

Three different radioiodination methods for human spleen ferritin compared.

Clin. Chem. 25, 1826-1830, 1979

024 Boxer, L.A., T.D. Coates, R.A. Haak, J.B. Wolach, S. Hoffstein
and R.L. Baehner

Lactoferrin deficiency associated with altered granulocyte function.

New. Engl. J. Med. 307:404-410, 1982

025 Braatz, J.A., D.T. Hua and G.L. Princler

Serum levels of a human lung tumor-associated antigen using an improved radioimmunoassay.

Cancer Res. 43: 110-113, 1983

026 Braatz, J.A., D.T. Hua, G.L. Princler

A solid-phase, enzyme-linked immunosorbent assay for a human lung tumor-associated antigen.

J.Natl. Cancer Inst. 72 (4):841-846, 1984

- 027 Breton-Gorius, J., D.Y. Mason, D. Barriot, J.L. Vilde, C. Griscelli

Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent infection.

Am. J. Pathol. 99:413-420, 1980

- 028 Briesse, V., P.O. Willroth, J. Brock, W. Straube

Tumor markers (alpha-2-macroglobulin, secretory immunoglobulin-A, pregnancy associated alpha-2-glycoprotein) in lung cancer patients.

Arch. f. Geschwulstforschg. 54 (5) 391, 1984

- 029 Brown, R.D., K.A. Rickard and H. Kronenberg

Immunoradiometric assay of plasma lactoferrin.

Pathology 15:27-31, 1983

- 030 Buchegger, F., M. Schreyer, S. Carrel and J.P. Mach

Monoclonal antibodies identify a CEA crossreacting antigen of 95 kD (HCA-95) distinct in antigenicity and tissue distribution from the previously described HCA of 55 kD.

Int. J. Cancer 33 (5):643-649, 1984

- 031 Bufile, D., Rimbaut, G.

Immunosuppressive effect of a human hepatic glycoferroprotein, alpha-2 H-globulin. A study on the transformation of normal human lymphocytes.

Immunology, 29:157-184, 1975

- 032 Burt, R.W., Ratcliffe, J.G., Stack, B.H., Cuthbert, J., Kennedy, R.S., Corker, C.S., Franchimont, P., Spilg, W.G., Stimson, W.H.

Serum Biochemical Markers in lung Cancer

Brit. J. Cancer 37, 714-717, 1978

033 Burtin, P.,

The carcinoembryonic antigen of the digestive system (CEA) and the antigens cross-reacting with it.

Ann-Immunol (Inst.Pasteur) 129 C, 185-198, 1978

034 Canivet, B., C.M. Balanne, B.P. Krebs, J.M. Aubanel, B. Blaive,

Carcinoembryonic antigen and cancer of the lung: two-way determination.

Tumor Diagnostik 4:203-207, 1980

035 Carney, D.M., P.J. Marangos, D.C. Ihde, P.A. Bunn, H.H. Cohen, J.D. Michel, A.F. Gazdar

Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer.

The Lancet I: No. 8272:583, 1982

036 Caselitz, K., T. Jaup, G. Seifert

Lactoferrin and lysozyme in carcinomas of the parotid gland. A comparative immunocytochemical study with the occurrence in normal and inflamed tissue.

Virchows Archiv 394:61, 1981

037 Casey, G., Z. Rudzki and R.J. Kimber

Reduction of the high dose hook effect in the serum ferritin assay.

Brit. J. Haematol. 43:675-677, 1979

038 Castelli, M., M. Viora, E. Costantini, P. Coloni, A. Lococo and E. Segà

CEA in tumor tissue extracts: the clinical significance of localization and concentration in human lung cancer.

IRCS Med. Sci-Biochem. 10:674, 1982

- O39 Coalson, J.J., Mohr, J.A., Pirtle, J.K., Dee, A.L., Rhoades, E.R.

Electron microscopy of neoplasma in the lung with special emphasis on the alveolar cell carcinoma.
Am. Rev. Respirat. Dis. 101:181, 1970

- O40 Concannon, J.P., Dalbow, M.H., Davis, W., Hodgson, S.E., Mitchell, J., Markopoulos, E.

Immunoprofile studies for patients with bronchogenic carcinoma-III. Multivariate analysis of immunotests in correlation with survival.
Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 4:255, 1978

- O41 Concannon, J.P., Dalbow, M.H., Hodgson, S.E., Headings, J.J., Markopoulos, E., Mitchell, J., Cushing, W.J., Liebler, G.A.

Prognostic value of preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) plasma levels in patients with bronchogenic carcinoma.
Cancer 42, 1477-1483, 1978

- O42 Courtoy, P.J., Moguilevsky, N., Retegui, L.A., Castracane, C.E. and Masson, P.L.

Uptake of lactoferrin by the liver. II. Endocytosis by sinusoidal cells.
Lab. Invest. 50 (3): 329-334, 1984

- O43 Cuatrecasas, P. and Anfinsen, C.B.

Affinity chromatography
Ann. Rev. Biochem. 40, 259, 1971

- O44 Curleing, J.M.,

The use of Sephadex in the separation, purification and characterization of biological materials.
In Exp. in Physiol. and Biochem. 3, 417-484, 1970
Ed. G.A. Kerkut, Academic Press London-New York

- 045 Dellon, A.L., Regentine, G.N., Chretien, P.B.
Prolonged survival in bronchogenic carcinoma
associated with HLA-antigens W-19 and HLA 5:
A preliminary report.
J. Natl. Cancer Inst. 54:1283, 1975
- 046 Del Villano, B.C., Brennan, S., Brock, P., Bucher, C.,
Liu, V., McClure, M., Rake, B., Space, S., Westrick, B.,
Shoemaker, H. and Zurawski, V.R.
Radioimmunometric assay for a monoclonal antibody-
defined tumor marker, Ca 19-9.
Clin. Chem. 29:549-552, 1983
- 047 Dent, P.R., Louis, J.A., McCulloch, P.B., Dunnett, C.W.,
Cerottini, J.C.
Correlation of elevated C1q binding activity and
carcinoembryonic antigen levels with clinical
features and prognosis in bronchogenic carcinoma.
Cancer 45:130-136, 1980
- 048 Deppe, W.M., Joubert, S.M., Maidoo, P.
Radioimmunoassay of serum ferritin
J. Clin. Pathol. 31, 872-877, 1978
- 049 Determann, H.
Gel Chromatography
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1968
- 050 De Young, H.J., Ashman, L.K.
Physicochemical and immunochemical properties
of carcinoembryonic antigen (CEA) from different
tumour sources.
Austr. J. Exp. Biol. 56, 321-331, 1978

051 Douwes, F.R., Hüttemann, U., Mross, K.

Immunodiagnosis of malignant disease

I. The electrophoresis-mobility test in the
diagnosis of bronchial carcinoma.

DMW 102:419, 1977

052 Drysdale, J.W., Munro

Small-scale isolation of ferritin for the assay
of the incorporation of 14 C-labelled amino acids.

Biochem. J. 95:851-858, 1965

053 Drysdale, J.W., Singer, R.M.

Carcinofetal human isoferritins in Placenta and
Hela Cells.

Cancer Research 34, 3352-3354, 1974

054 Drysdale, J.W.

Ferritin in cancer: biochemical perspectives

In F.G. Lehmann "Carcino-embryonic proteins,"

Vol.I, pp 249-259, 1979. Elsevier/North-

Holland Biomedical Press

055 Dunn, C.D. and Boden D.J.

Three commercial immunoradiometric "kit" assays
for serum ferritin evaluated.

Clin. Chem. 27:1280-1283, 1981

056 Eder, M., Gedick, P.

Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Patho-
logischen Anatomie.

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1975

Immunologie: S. 175-202

Pathologie von Wachstum und Differenzierung:

S. 203-264

Bronchial-(Lungen) Tumoren: S. 605-610

- 057 Ellison, M.L., Lamb, D., Rivett, J., Neville, A.M.
Quantitative aspects of carcinoembryonic antigen
put by a human lung carcinoma cell line.
J. Natl. Canc. Inst. 59, 1977
- 058 Engvall, E., Shively, J.E., Wrann, M.
Isolation and characterization of normal cross-
reacting antigen. Homology of its NH₂-terminal amino
acid sequence with that of carcinoembryonic antigen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1670-1674, 1978
- 059 Estevenon, J.P. and Figarella, C.
A non competitive enzyme immunoassay of human
lactoferrin in biological fluids.
Clin. Chem. Acta 129 (3):311-318, 1983
- 060 Fagard, R., Saddi, R.
Ferritin: Structure and biosynthesis
Biochemie 59:765, 1977
- 061 Fedail, S.S., Harvey, R.F., Salmon, P.R., Read, A.E.
RIA of lactoferrin in pancreatic juice as a test
for pancreatic diseases.
Lancet I: 8057: 181, 1978
- 062 Figarella, C. et al.
Measurement of lactoferrin in pancreatic juice.
Lancet I: No. 8073:105, 1978
- 063 Figarella, C., Gaia, E., Piantino, P.
Plasma lactoferrin levels in patients with chronic
calcifying pancreatitis.
Digestion 27 (3): 185-187, 1983

- 064 Ford, C.H., Newmann, C.E., Lakin, J.
Role of carcinoembryonic antigen in bronchial carcinoma.
Thorax 32, 5:582-588, 1977
- 065 Ford, C.H., Hettiarachchi, J., Newmann, C.E.
Non-cross-reactivity of an anti-foetal-lung serum with human lung cancer cells in an indirect immunofluorescence test.
Brit. J. Cancer 37:473, 1978
- 066 Ford, C.H., Newmann, C.E. and Stokes, H.J.
Characterization of antisera raised to human lung cancers.
Serologic analysis of human cancer antigens Ed. St. A. Rosenberg, Acad. Press, N.Y. S. 277-301, 1980
- 067 Ford, C.H., Stokes, H.J., Newmann, C.E.
Carcinoembryonic antigen and prognosis after radical surgery for lung cancer. An immunocytochemical localization and serum levels.
Brit. J. Cancer 44:145-153, 1981
- 068 Frenkel, E.J., van Beld, B., van Oost, B.A., Marx, J.J.M.
Influence of heat treatment on rabbit liver ferritin.
Biochem. Biophys. Acta. 745, 202-208, 1983
- 069 Frenkel, E.J., van Beld, B. and Marx, J.J.
Influence of heat treatment on rabbit liver ferritin kinetics.
Brit.J. Haematol 55 (3):449-453, 1983
- 070 Frenoy, N. and Burtin, P.
Non-specific cross-reacting antigen serum concentration in myeloid leukemias.
Clin. Chem. Acta 103:23-31, 1980

- 071 Frenoy, N., Benbunant, M., Berruel, C., Child, J.A., Gendron, M.C., Missett, J.L., Razafimahaleo, E., Burtin, P.
An investigation of factors influencing serum NCA (non-specific cross-reacting antigen) level in patients with chronic myeloid leukaemia.
Brit. J. Cancer 46:765-772, 1982
- 072 Frost, M.J., Rodgers, G.T. Bagshawe, K.D.
Extraction and preliminary characterisation of a human bronchogenic carcinoma antigen.
Brit. J. Cancer 31:379-386, 1975
- 073 Gadler, H., Bremme, K. and Wahren, B.
Distribution of tumor-associated antigen CEA and cross-reacting NCA in fetal organs.
Internatl. J. Cancer 25:91-94, 1980
- 074 Gadler, F., Wahren, B.,
Decrease of a normal colon and granulocyte antigen (NCA) in whole lysed blood of myelosuppressed patients.
Scand. J. Haematol. 306 (4):297-302, 1980
- 075 Gaffar, S.A., Princler, G.L., McIntire, K.R., Braatz, J.A.
A human lung tumor-associated antigen cross-reactive with α_1 -antichymotrypsin.
J. Biol. Chem. 255:8334-8339, 1982
- 076 Ganz, P.A., Baras, M., Yeung MA., P., Elashoff, R.M.
Monitoring the therapy of lung cancer with α -1-acid glycoprotein.
Cancer Res. 44 (11), 5415, 1984
- 077 Gelotte, B. and Porath, J.
Gel Filtration
In "Chromatography", 2 nd edition, Ed. E. Heftmann
Reihold Publ. Corp. New York, 1967

078 Gennings, J.N. and Bagshawe, K.D.

A human bronchogenic carcinoma antigen.

Serologic analysis of human cancer antigens Ed.

St. A. Rosenberg/Academic Press N.Y. 1980

079 Gennings, J.N., Bagshawe, K.D., Axelsen, N.H., Sizaret, P.

Collaborative study on bronchial tumor-associated antigens.

Br. J. Cancer 44, 487-495, 1981

080 Ghielmi, S., Pizzoccolo, G., Iacobella, C., Albertini, A.,

Arosio, P.

Methodological effects on the quantitation of serum ferritin by radio- and enzymeimmunoassays.

Clin. Chem. Acta 120:285-334, 1982

081 Giler, S., Moroz, C.

Significance of ferritin in malignant diseases

Biomed. 28:203-206, 1978

082 Gold, P., Freeman, S.O.

Specific carcinoembryonic antigen of the human digestive system.

J. exp. Med. 122, 467-481, 1965

083 Goldenberg, D.M., DeLand, F.H., Kim, E., Bennett, S.,

Primus, F.J., Nagell, J.R., Estes, N., DeSimone, P.,

Rayburn, P.

The use of radiolabeled antibodies to carcino-embryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photocanning.

N. Engl. J. Med. 298, 1384-1398, 1978

084 Gonyea, L.M.,

Purification and iodination of antibody for use in an immuno-radiometric assay for serum ferritin.

Clin. Chem. 23:234-236, 1977

- 085 Goslin, R.H., A.T. Skarin, Zamcheck, N.
Carcinoembryonic antigen.
A useful monitor of therapy of small-cell lung carcinoma.
J A M A 246:2173-2176, 1981
- 086 Goslin, R.H., Brien, M.J, A.T. Skarin and N. Zamcheck
Immunocytochemical staining for CEA in small cell carcinoma of lung predicts clinical usefulness of the plasma assay.
Cancer 52 (2):301-306, 1983
- 087 Granick, S.
Structure and physiological functions of ferritin.
Physiol. Rev. 31, 489-511, 1951
- 088 Granlund, D.J., Ritts, R.E.
Soluble Proteins of Human Bronchogenic Carcinoma
Mayo-clinic Proc. 51:19, 1976
- 089 Gropp, K., Havemann, K., Preisser, P.,
Tumor-associated antigens in bronchial carcinoma, p. 547-551 in F.G. Lehmann "Carcino-embryonic proteins", Vol. II, Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1979
- 090 Gropp, K.,
BCG und Levamisole
Ztschr. f. Imm.forschg. 153:236-272, 1977
- 091 Gropp, K., Lehmann, F.G., Bauer, H., Havemann, K.,
Carcinoembryonic antigen, α_1 -fetoprotein, ferritin and α_2 -pregnancy associated glycoprotein in the serum of lung cancer patients and its demonstration in lung tumor tissues.
Oncology 34:267, 1977

- 092 Gropp, C., K. Havemann, F.G. Lehmann
Carcinoembryonic antigen and ferritin in patients
with lung cancer before and during therapy.
Cancer 42:2802-2808, 1978
- 093 Gropp, C., Havemann, K., Scherfe, T., Ax, W.
Incidence of circulating immune complexes in
patients with lung cancer and their effect on
antibody-dependent cytotoxicity.
Oncology 37:71-76, 1980
- 094 Gropp, C., Havemann, K., Scheuer, A.
Ectopic hormones in lung cancer patients at dia-
gnosis and during therapy.
Cancer 46:347-354, 1980
- 095 Gropp, C., Havemann, K., Scheuer, A.
The use of carcinoembryonic antigen and peptide
hormones to stage and monitor patients with lung
cancer.
Internat. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 6:1047-1053,
1980
- 096 Gropp, C., W. Luster
Tumormarker beim Bronchialkarzinom: Parameter für
Frühdiagnostik, Stadieneinteilung und Therapiekon-
trolle.
Laborat. blätter 32:49, 1982
- 097 Guilleux, F. and A. Wagner
A new radioimmunoassay of serum ferritin: use of
¹²⁵I-labeled human spleen antigen and a solid
phase second antibody.
Int. J. Nucl. Med. Biol. 8:17-26, 1981

- 098 Gutteberg, T.J., B. Haneberg and T. Jorgensen
The latency of serum acute phase proteins in meningo-
coccal septicemia, with special emphasis on lacto-
ferrin.
Clin. Chim. Acta 136(2-3)173-178, 1984
- 099 Hadorn, W., Stucki, P.
Lehrbuch der Therapie
Bern, Stuttgart, Wien: Huber 1977 6. Auflage
- 100 Hallgern, R., E. Nou, G. Lundquist
Serum beta₂-microglobulin in patients with bronchial
carcinoma and controls.
Cancer 45:780, 1980
- 101 Halliday, J.W., K.L. Gera, L.W. Powell
Solid-phase radioimmunoassay for serum ferritin
Clin. Chem. Acta 58, 207-214, 1976
- 102 Halliday, J.W., Rosso, A.M., Cowlishaw, J.L., Powell, L.W.
Serum-ferritin in diagnosis of haemochromatosis.
Lancet II:621, 1977
- 103 Hammarström, S., T. Svenberg, A. Hedin, G. Sundblad,
Antigens related to carcinoembryonic antigen.
Scand. J. Immunol. 7, Suppl. 6, 33-46, 1978
- 104 Harbitz, O., A.O. Jenssen, O. Smidsrod
Lysozyme and lactoferrin in sputum from patients
with chronic obstructive lung disease.
Eur. J. Resp. Dis. 65, 512-520, 1984
- 105 Hausmann, K., J. Drews, R. Trampe, I. Wedekind, E. Göltner,
R. Kuse, J. Düllmann
Die Serumferritinbestimmung in der Diagnostik des
Eisenmangels in J.P. Kaltwasser,
E. Werner "Serumferritin" Springer-Verlag Berlin,
Heidelberg, New York 1980

- 106 Hazard, J.T., Arioso, P., Drysdale, J.W.
Selective Quantitation of "carcinofoetal" isoferri-
tins in radioimmunoassay.
P. 749-755, W.H. Fishman/St. Sell, Onco-Developmental
Gene expression, Acad. Press in N.Y., San Francisco,
London, 1976
- 107 Hazard/Yokota/Arioso/Drysdale
Immunologic differences in human isoferritins
Implications for immunologic quantitation of serum
ferritin.
Blood 49:139-149, 1977
- 108 Hazard, J.T., Drysdale, J.W.
Ferritinemia in cancer, Nature 265:755-756, 1977
- 109 Hekman, A.
Association of lactoferrin with other proteins,
as demonstrated by changes in electrophoretic
mobility.
Biochem. Biophys. Acta 251, 380-387, 1971
- 110 Held, K. et al.
Bronchialkarzinom: TNM-System
Med. Klin. 72:357, 1977
- 111 Hijmans, W., Schnit, H.R., Klein, F.
An immunofluorescent procedure for the detection
of intracellular immuno-globulins.
Clin. Exp. Immunol. 4, 457, 1969
- 112 Hill, R., B. Dautner, S.K., Khoo, E.V. Mackay
Nature of carcinoembryonic antigen purified
from malignant ascites of serous adenocarcinoma
of the ovary.
Mol. Immunol. 18, 647-653, 1981

- 113 Holmes, E.C., Ramming, K.P., Mink, J., Coulson, W.F.,
Morton, D.L.
New method of immunotherapy for lung cancer.
Lancet II:586, 1977
- 114 Hornback, N.B., Einhorn, L., Shidnina, Hl, Joe, B.T.,
Krause, M., Furnas, B.
Early treatment results of combination radiation
therapy and chemotherapy
Cancer 37:2658-2664, 1976
- 115 Hornbostel H.
Innere Medizin in Praxis und Klinik, Band I
Thieme Stuttgart 1973
- 116 Hunter, W.M., F.C. Greenwood
Preparation of iodine-131 labelled human growth
hormone of high specific activity
Nature 194, 495-496, 1962
- 117 Hunter, W.M.,
Ria, Handbook of experimental Immunology, 2nd ed.
chapt. 17, Oxford 1973
- 118 Ishitani, K., Niitsu, Y., N. Watanabe, J. Koseki, J. Oikawa,
Y. Kadono, T. Ishii, Y. Goto, Y. Onodera and I. Urushizaki
Clinical evaluation of serum ferritin for sero-
diagnosis of cancer.
Carcino-Embryonic Proteins, Vol. I, P. 279-285, Ed,
F.G. Lehman Elsevier/North-Holland Biomed. Press,
1979
- 119 Jacobs, A., A. Slater, J.A. Whittaker, G. Canellos, P.H.
Wernik
Serum ferritin concentration in untreated Hodgkin's
disease.
Brit. J. Cancer 34, 162-166, 1976

- 120 Jamasbi, R.B., Nettesheim, P., Kennel, S.J.
Detection of circulating tumor antigens in mice carrying a highly metastatic pulmonary squamous-cell carcinoma.
Int. J. Cancer 21:387, 1978
- 121 James, D.G.
Is immunotherapy of any value for bronchial carcinoma?
Schweiz. Med. Wschr. 107:421, 1977
- 122 Jansen, H.M., The, T.H., De Gast, G.C., Esselink, M.T.,
Van der Wal, A.M., Orie, N.G.
Adjuvant immunotherapy with BCG in squamous-cell bronchial carcinoma. Immunoreactivity in relation to immunostimulation (preliminary results in a controlled trial)
Thorax 33:429, 1978
- 123 Joachim, H.L., Dorsett, B.H., Paluch, E.
Immune response at tumor site in lung carcinoma.
Cancer 38:2296, 1976
- 124 Jones, B.M., M. Worwood, A. Jacobs,
Serum ferritin in patients with cancer: determination with antibodies to HeLa cell and spleen ferritin.
Clin. Chim. Acta 106, 203-214, 1980
- 125 Kay, A.B., Smith, A.F., McGavin, C.R., Tuft, S.B.
Immunoglobulins and complement in pleural effusions associated with bronchogenic carcinoma.
J. Clin. Path. 29:887, 1976

- 126 Kelly, B., Levy, J.G.
Evidence of a common tumorassociated antigen in
extracts of human bronchogenic carcinoma.
Brit. J. Cancer 35:828, 1977
- 127 Kelly, U.L., E.H. Cooper, C. Alexander, J. Stone
The assessment of antichymotrypsin in cancer
monitoring.
Biomed. 28:209-215, 1978
- 128 Kelly, B.S., J.G. Levy
Purification of a protein associated with
human bronchogenic squamous-cell carcinoma.
Brit. J. Cancer 39:224-233, 1979
- 129 Kelly, B.S., J.G. Leavy
Detection of tumor - associated antigens in
human bronchogenic carcinoma by the enzyme-
linked immuno sorbent assay (ELISA)
Brit. J. Cancer 41:388-398, 1980
- 130 Kelly, B.S., U. Stredulinsky, J. van den Hoek, J.G. Levy
Antibodies in the sera of patients with broncho-
genic carcinoma that react with antigen from
a tumor cell line. I. An assay system.
Cancer Immunol. Immunother. 12, 5-20, 1981
- 131 Kempner, D.H., M.R. Jay, R.H. Stevens
Human lung tumor-associated antigens of 32 000
daltons molecular weight.
J. Natl Cancer Inst. 63:1121-1127, 1977
- 132 Kerman, R.H., Stefani, S.S.
Effect of BCG-Immunotherapy on the active T
and total T-RFC in patients with lung cancer.
Cancer Immunol. Imm. Ther. 4:41, 1978

- 133 Kessler, M.J., J.E. Shively, D.G. Pritchard, C.W. Todd
Isolation, immunological characterization and
structural studies of a tumor antigen related
to carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 38, 1041-1048, 1978
- 134 Kew, M.C., Torrance, J.D., Derman, D., Simon, M., Macnab
G.M., Charlton, R.W., Bothwell, T.H.
Serum and tumor ferritins in primary liver cancer
Gut 19: 294, 1978
- 135 Kijimoto-Ochiai, S., A. Makita, T. Kodama, E. Araki and
T. Yoneyama
Elevation of glycoprotein galactosyltransferase
activity in human lung cancer related to histolo-
gical types.
Cancer Res. 41:2931, 1981
- 136 v. Kleist, S., G. Chavenel, P. Burtin
Identification of an antigen from normal human
tissue that crossreacts with the Carcinoembryon-
ic Antigen.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2492-2494, 1972
- 137 Kleist, S.v., S. Troupel, M. Kine, P. Burtin
Determination of levels of carcinoembryonic anti-
gen and nonspecific cross-reacting antigen in the
sera of neonatal infants: brief communication.
J. Natl. Canc. Inst. 59:1621-1628, 1977
- 138 Kleist, S.v., M. King, K. Havemann
Demonstration of antibodies in patients' sera
directed against nonspecific cross-reacting anti-
gen.
J. Natl Canc. Inst. 61, 1385-1389, 1978

- 139 Kleist, v.S., Burtin, P.
Antigens cross-reacting with CEA.
Aus R.B. Herberman, K.R. McIntire (Ed.)
"Immunodiagnosis of Cancer", M. Dekker
Inc. N.Y., Basel 1979 P. 322-342
- 140 Knedel, M. und Sperl, F.
Über ein präparatives Verfahren der
Elektrophorese mit Kartonpapier als Träger-
material, Blut,
Band V, Heft 2, 65-90, 1959
- 141 Knedel, M. und Fateh-Moghadam, A.
Die Gradientenelutionschromatographie
G II, 10, 675-684, 1965
- 142 Knedel, M., Fateh-Moghadam, A.
Säulenchromatographische Untersuchungen von
Paraproteinen an Ionenaustauschern.
Klin.Wschr. 46, 1078-1092, 1968
- 143 Kotlar, H.K.
Purification of a cancer-associated protein
factor in serum of lung cancer patients.
Europ. J. Cancer Clin. Oncol. 20 (6):817-828,
1984
- 144 Krauss, S., Macy, S., Ichiki, A.T.
A study of immunoreactive calcitonin (CT)
adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and carcino-
embryonic antigen (CEA) in lung cancer and
other malignancies.
Cancer 47:2485-2492, 1981
- 145 Krupey, J., Wilson, T., Freedman, S.O., Gold, P.
The preparation of purified carcinoembryonic
antigen of the human digestive system for large
quantities of tumor tissue.
Immunochem. 9, 617-622, 1972

- 146 Kubasik, N.P., Ricotta, M., Hunter, T., Sine, H.E.
Evaluation of a new ferritin radioimmunoassay
kit.
Clin.Chem. 27:505, 1981
- 147 Kuroki, M., Koga, Y., Matsuoka, Y.
Purification and characterization of carcino-
embryonic antigen-related antigens in normal
adult feces.
Cancer Res. 41, 713-720, 1981
- 148 Kuroki, M., Shinoda, T., Takayasu, T., Koga, Y., Matsuoka,
Y.
Immunological characterization and structural
studies of normal fecal antigen-1 related to
carcinoembryonic antigen.
Mol. Immunol. 19, 399-406, 1982
- 149 Lamerz, R., Fateh-Moghadam, A.
Carcinofetale Antigene
a I Alpha-Fetoprotein (AFP)
b II Carcinoembryonales Antigen (CEA)
c III Andere carcinofetale Antigene
Klin.Wschr. 53, I S. 147-169, 1975
II S. 193-203
III S. 403-417
- 150 Lamerz, R.
Ferritin and cancer
II. Congreso internacional de pathologia clinica
institutional.
XXVIII Congreso nacional de la asociacion
espanola de biopathologia clinica.
Madrid, 14-17.09.1981
Kongreßband II
Editorial Garsi S.A.
London-Madrid, S. 63-67, 1981

- 151 Lamerz R. und Burtin P.
Immunological comparison of carcinoembryonic antigens (CEA) extracted from tumours of various organs: their use in radioimmunological CEA determinations.
Br. J. Cancer 47, 823-832, 1983
- 152 Lee, M., Burgett, M.W.
A solid phase enzyme immunoassay for the quantitation of serum ferritin.
Clin. Chim. Acta 112:241-246, 1981
- 153 Lemarie, C., Lavandier, M., Renoux M. and Renoux, G.
Carcinoembryonic antigen in bronchoalveolar lavage fluid.
New Engl. J. Med. 303:586-587, 1980
- 154 Linder, M.C., Munro, H.N.
Assay of tissue ferritin.
Anal. Biochem. 48, 266-278, 1972
- 155 Linder, M.C., Moor, J.R., Wright, K.
Ceruleoplasmin assay in diagnosis and treatment of human lung, breast, and gastrointestinal cancers.
J. Natl Cancer Inst. 67:263, 1981
- 156 Linder, M.C., Wright, K., Madara, J.
Concentration, structure and iron saturation of ferritins from normal human lung and lung tumors with graded histopathology.
Enzyme 27:189, 1982
- 157 Lo Gerfo, P., Herter, F.P., Braun, J. and Hansen, H.J.
Tumor associated antigen with pulmonary neoplasma.
Ann. Surg. 175:495-500, 1972

158 Lokich, J.J.

Plasma CEA levels in small cell lung cancer:
correlation with stage, distribution of
metastases and survival.
Cancer 50:2154-2156, 1982

159 Lütthgens, M., Schlegel, G.

Verlaufskontrolle bei Bronchialkarzinomen
mit Tissue Polypeptide Antigen und Carcino-
embryonalem Antigen.
Tumor Diagnostik & Therapie 6, 1-7, 1985

160 Luporini, G. et al.

Carcinoembryonic Antigen revisited.
Lancet I (8014):756, 1977

161 Mach, J.P. and Pusztaszeri, G.

CEA: Demonstration of a partial identity
between CEA and a normal glycoprotein.
Immunochem. 9, 1031-1034, 1972

162 Manabe, H., Yasumoto, K., Ohta, M., Toyohira, K., Nomoto,
K.

Effect of anticancer therapy on lymphocyte
toxicity in lung cancer patients.
Gann 68:477, 1977

163 Makoski, H.B., Schmitt, G., Osieka, R., Schmidt, C.G.

Integrierte Behandlung des inoperablen Bronchial-
karzinoms
Strahlentherapie 153:649-654 (Nr. 10), 1977

164 Malmquist, J., Hansen, N.E., Karle, H.

Lactoferrin in Haematology.
Scand. J. Haematol. 21:5-8, 1978

- 165 Marabella, P.C., Takita, H., Lane, W.W., Preffer, F.I.
Squamous cell carcinoma of the lung
Clinopathologic study
Chest 71:497, 1977
- 66 Marcus, D.M., Zinberg, N.
Measurement of Serum Ferritin by Radioimmuno-
assay:Results in normal individuals and
patients with breast cancer.
J. Natl. Cancer Inst. 55:4, 791-795, 1975
- 167 Mason, D.Y., Taylor, C.R.
Distribution of transferrin, ferritin and
lactoferrin in human tissues.
J. clin. Pathol. 31:316, 1978
- 168 Matsuoka, Y., Kuroki, M., Koga, Y., Kuriyama, H., Mori,
T. and Kosaki, G.
Immunochemical differences among carcinoembryonic
antigen in tumor tissues and related antigens in
meconium and adult feces.
Cancer Res. 42:2012, 1982
- 169 McIntire, R.K., Braatz, J., A. Shaik, A. Gaffar, G. Princier,
L. Kenneth, H. Kortright.
Development of a Radioimmunoassay for a lung tumor
associated antigen.
In F.G. Lehmann "Carcinoembryonic proteins",
P. 533-540, Elsevier/North-Holland Biomedicalpress,
1979
- 170 McKenzie, C.G., Evans, I.M., Hillyard, C.J., Hill, P.,
Carter, S., Tan, M.K., Macintyre, I.
Biochemical markers in bronchial carcinoma.
Brit. J. Cancer 36:700-707, 1977

- 171 McKneally, M.P., Maver, C., Klausel, H.W., Alley, R.D.
Regional immunotherapy with intrapleural BCG
for lung cancer (surgical considerations)
J. Thor. Cardiovasc. Surg. 72:333, 1976
- 172 Melamed, M., Flehinger, B., Miller, D., Osborne, R.,
Zaman, M., McGinnis, C., Martini, N.
Preliminary report of lung cancer detection
program in New York.
Cancer 39:369-382, 1977
- 173 Meltzer, M.S., Leonard, E.J., Rapp, H.J., Borsos, T.
Tumor-specific antigen solubilized by
hypertonic potassium chloride.
J. Natl. Cancer Inst. 47:703, 1971
- 174 Merrill, W.W., Goodman, M., Matthay, R.A., Naegel, G.P.,
J.P. Vandervoor, Myl, A.D. and Reynolds, H.Y.
Quantitation of carcinoembryonic antigen in the
lung lining fluid of normal smokers and non-
smokers.
Amer. Rev. Resp. Dis. 123,29-31, 1980
- 175 Miles, L.E., Lipschitz, D.A., Bieber, C.P., et al.
Measurement of serum ferritin by a 2-site
immunoradiometric assay.
Anal. Biochem. 61:209-224, 1974
- 176 Miyauchi, J.
Distribution and subcellular localization of
lactoferrin in human tissues with special
reference to the submandibular gland.
Acta Histochem. Cytochem. 17 (1):77, 1984
- 177 Moguilevsky, N., Retegui, L.A., Courtoy, P.J.,
Castracane, C.E., Masson, P.L.
Uptake of lactoferrin by the liver. III Critical
role of the protein moiety.
Lab. Invest. 50 (3):335-340, 1984

- 178 Mohapatra, N., Lynn, W.S. and Bhattacharya, S.N.
Characterization of a glycoprotein isolated
from a continuous tumor-cell line of human
lung carcinoma.
Biochem. Biophys. Acta 760, 398-402, 1983
- 179 Mohr, J.A., Nordquist, R.E., Coalson, R.E., Rhoades,
E.R., Coalson, J.J.
Alveolar cell carcinoma-like antigen and anti-
bodies in patients with alveolar cell carcinoma
and other cancers.
Cancer Res. 34:1904-1907, 1974
- 180 Mohr, J.A., Nordquist, R.E., Coalson, R.E., Rhoades,
E.R., Coalson, J.J.
Lymphocyte-associated antigens in patients
with alveolar cell carcinoma
J. Labor. and Clin. Med. 86:490-493, 1975
- 181 Moroz, C., Lahat, N., Biniaminov, M., Ramot, B.
Ferritin on the surface of lymphocytes of
Hodgkin's disease patients: a possible
blocking substance removed by levamisole.
Clin. Exp. Immunol. 29, 30-34, 1977
- 182 Moroz, C., Giler, S., Kupfer, B., Ureca, I.
Ferritin-bearing lymphocytes and T-cell levels
in peripheral blood of patients with breast
cancer.
Cancer Immunol. Immunother. 3, 101-105, 1977
- 183 Morton, D.J., Holmes, E.C., Golub, S.H.
Immunologic aspects of lung cancer.
Chest 71:640, 1977

- 184 Mulshine, J.L., Cuttitta, F., Bibro, M., Fedorko, J., Fargion, S., Little, C., Carney, D.N., Gazdar, A.F. and Minna, J.D.
Monoclonal antibodies that distinguish non-small cell from small cell lung cancer.
J. Immunol. 131 (1):497, 1983
- 185 Munro, H.N., Jinder, M.C.
Ferritin: Structure, biosynthesis and role in iron metabolism.
Physiol. Rev. 58:317-396, 1978
- 186 Nash, D.R., McLaety, J.W., Fortson, N.G.
Pretreatment, prediagnosis immunoglobulin and alpha₁-antitrypsin levels in patients with bronchial carcinoma
J. Natl Cancer Inst. 64:721, 1982
- 187 Newmann, C.E., Ford, C.H., Parkers, E.
Preparation and characterisation of an anti-serum to cultered human oat cell carcinoma cells.
Brit. J. Cancer 37:780, 1978
- 188 Niitsu, Y., Kohgo, Y., Ohtsuka, S., Watanabe, N., Koseki, J., Shibata, K., Ishitani, K., Nagai, T., Gocho, Y., Urushizaki, I.
Ferritins in serum and tissues and their implications in malignancy.
W.H. Fishman/St. Sell, "Onco-Developmental Gene Expression", P. 757-762
Acad. Press Inc. N.Y., S. Franc., London, 1976
- 189 Niitsu, Y., Kohgo, Y., Yokota, M., Urushizaki, J.
Radioimmunoassay of serum ferritin in patients with malignancy.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 259, 450-452, 1975

- 190 Nishiyama, T., Stolbach, L.L., Rule, A.H., Delellis, R.A., Inglis, N.R., Fishman, W.H.

Expression of oncodevelopmental markers (Regan isozyme, beta-HCG, CEA) in tumor tissues and uninvolved bronchial mucosa. An immunohistochemical study.

Acta Histochem. Cytochem. 13:245-253, 1980

- 191 Nissen, M.H., Plesner, T., Rorth, M.

Modification of beta₂-microglobulin in serum from patients with small cell carcinoma of the lung-correlation with the clinical course.

Clin. Chim. Acta 141 (1):41, 1984

- 192 Nordquist, R.E.

Specific antigens in human alveolar cell carcinoma

Cancer Res. 33, 1790, 1973

- 193 Ochi, Y., Ura, Y., Hamazu, M., Fujima, Y., Kajita, Y., Ishida, M., Miyazaki, T., Tamura, K.

Immunochemical identification of an alpha₁-acid glycoprotein-antigenic determinant on carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific cross-reacting antigen (NCA)

Clin. Chim. Acta 138:9-19, 1984

- 194 Oertel, J., Gerhartz, H.

Die Ferritinkonzentrationen im Serum bei verschiedenen Typen der Eisenmangelanämie.

Dtsch. Med. Wschr. 102:1147-1150, 1977

- 195 Oertel, J., Bombik, B.M., Stephan, M., Gerhartz, H.

Ferritin in bone marrow and serum in iron deficiency and iron overload.

Blut 37:113, 1978

- 196 Oldham, R.K., Weese, J.L., Herberman, R.B., Perlin, E.,
Mills, M., Heims, W., Blom, J., Green, D., Reid, J.,
Bellinger, S., Law, I., McCoy, J.L., Dean, J.H., Cannon,
G.B., Djeu, J.

Immunological monitoring and immunotherapy in
carcinoma of the lung.

Int. J. Cancer 18:739, 1976

- 197 Oseas, R., Yang, H.H., Baehner, R.L., Boxer, L.A.
Lactoferrin: A promoter of polymorphonuclear
leukocyte adhesiveness.

Blood 57:939-945, 1981

- 198 Uchterlony, Ö.

Diffusion in gel methods for immunological
analysis.

Progress in Allergy 5:1, 1958

- 199 Uchterlony, Ö.

Diffusion in gel methods for immunological
analysis II.

Progress in Allergy 7:30, 1962

- 200 Paone, J.F., Kardana, A., Rogers, G.T., Dhasmana, J.,
Jeyasingham, K.

Preoperative carcinoembryonic antigen levels
correlated with postoperative pathological
staging in bronchial carcinoma.

Thorax 35:920-924, 1980

- 201 Papenhausen, P.R., Emeson, E.E., Croft, C.B. and B.
Borowiecki.

Ferritin-bearing lymphocytes in patients with
cancer.

Cancer 53 (2):267-271, 1984

- 202 Parry, D.H., Ricketts, C., Jacobs, A.
Serum ferritin during unmaintained remission in
acute lymphoblastic leukemia.
Brit. Med. J. 2:1341, 1978
- 203 Pascal, R.R., Mesa-Tejada, R., Bennett, S.J., Garces, A.,
Fenoglio, C.M.
Carcinoembryonic Antigen: Immunohistologix identi-
fication in invasive and intraepithelial carcino-
ca of the lung.
Arch. Pathol. Lab. Med. 101:568-571, 1977
- 204 Pattengale, P.K., Taylor, G.R., Engvall, E., Ruoslahti, E.
Direct tissue visualization of normal cross-
reacting antigen in neoplastic granulocytes.
- 205 Pauwels, R., M. von der Straeten
Plasma levels of carcinoembryonic antigen in
bronchial carcinoma and chronic bronchitis
Thorax 30:560-562, 1975
- 206 Penders, T.J., De Rooij-Dijk, H.H., Liejnse, B.
Rapid isolation of ferritin by means of ultra-
centrifugation.
Biochim. Biophys. Acta, 168, 588-590, 1968
- 207 Piper, W.
Innere Medizin
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork, 1974
- 208 Primus, F.J., Freeman, J.W., Goldenberg, D.M.
Immunological heterogeneity of carcinoembryonic
antigen: purification from meconium of an antigen
related to carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 43, 697-685, 1983

- 209 Rado, T.A., Bollekens, J., Laurent, G.St., Parker, L., Benz, E.J.

Lactoferrin biosynthesis during granulocytopoiesis.

Blood 64 (5):1103, 1109, 1984

- 210 Rasmuson, T., Björk, G.R., Damber, L., Holm, S.E., Jacobsson, L., Jeppson, A., Stigbrand, T., Westman, G.

Tumor markers in bronchogenic carcinoma. An evaluation of carcinoembryonic antigen, tissue polypeptide antigen, placental alkaline phosphatase and pseudouridine midine.

Acta Radiol. Oncol. 22, Fasc. 3:209-214, 1983

- 211 Reitamo, S., Konttinen, Y.T., Dodd, S., Adinolfi, M.

Distribution of lactoferrin in human fetal tissues.

Acta Paediat. Scand. 70:395-398, 1981

- 212 Retegui, L.A. Moguilevsky, N., Castracane, C.E., Masson, P.L.

Uptake of lactoferrin by the liver. I. Role of the reticuloendothelial system as indicated by blockade experiments.

Lab. Invest. 50 (3):323-328, 1984

- 213 Ritts, R.E., Del Villano, B.B., Go, V.I., Herberman, et al.

Initial clinical evaluation of an immunoradiometric assay for ca 19-9 using the NCI serum bank.

Int. J. Cancer 33 (3):339-345, 1984

- 214 Rodbard, D., Bridson, W., Rayford, P.L.

Rapid calculation of radioimmunoassay results.

- 215 Rogers, G.T.

Carcinoembryonic antigens and related glycoproteins

Biochim. Biophys. Acta 695, 227-249, 1983

- 216 Ronquist, G. and Hou, E.
Serum Sialyltransferase and Fucosyltransferase
activities in patients with bronchial carcinoma.
Cancer 52 (9):1679, 1983
- 217 Rosen, S.T., Mulshine, J.J., Cuttitta, F., Fedorko, J.,
Carney, D.N., Gatdar, A.F., Minna, J.D.
Analysis of human small cell lung cancer
differentiation antigens using a panel of rat
monoclonal antibodies.
Cancer Res. 44 (5):2052, 1984
- 218 Ruoslahti, E.
Immunoabsorbents in protein purification.
Scand. J. Immunol. Suppl. No 3, 1976
Universitetsforlaget - Oslo
- 219 Ryley, H.C., Brogan, T.D.
Quantitative immunoelectrophoretic analysis of
the plasma-proteins in the sole-phase of sputum
from patients with chronic bronchitis.
J. Clin. Pathol. 26, 852-856, 1973
- 220 Saab, G.A., Green, R., Crosby, W.H.
Rapid assay for measurement of serum ferritin.
Amer. J. Clin. Pathol. 70:275, 1978
- 221 Sachs, L.,
Statistische Auswertungsmethoden, 3. Auflage
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1972
- 222 Said, J.W., Nash, G., Tuepper, G., Banks-Schlegel, S.
Keratin proteins and carcinoembryonic antigen
in lung carcinoma: an immunoperoxidase study
of 54 cases, with ultrastructural correlations.
Human Pathol. 14 (1):70-76, 1983

- 223 Santen, R.J., Collette, J., Franchimont, P.
Partial purification of carcinoembryonic
reactive antigen from breast neoplasma
using lectin and antibody affinity chromato-
graphy.
Cancer Res. 40, 1181, 1980
- 224 Sega, E., Citro, G., Natali, P.G.
Partial characterization of a fetal lung
antigen associated with human bronchogenic
carcinoma.
J. Natl. Cancer Inst. 62:1125-1128, 1979
- 225 Sephadex-Gel filtration in theory and practice.
Broschüre der Fa. Pharmacia Fine Chemicals AB
Uppsala, Schweden 1976
- 226 Shively, J.E., Spayth, V., Chang, F.F., Metter, G.E.,
Klein, L., Presant, C.A., Todd, C.W.
Serum levels of carcinoembryonic antigen and a
tumor-extracted carcinomembryonic antigen-
related antigen in cancer patients.
Cancer Res. 42:2506-2513, 1982
- 227 Sizaret, P., Martin, F.
CEA in extracts of pulmonary cancers.
J. Natl. Cancer Inst. 50, 807-810, 1973
- 228 Smith, K.O., Gehle, W.D., Newman, J.D., Standley, D.L.,
Voltz, P.W.
Approach to serodiagnosis of human lung cancer-
cell culture lines reactive as antigens with
tumor patients sera.
Cancer 38:157, 1976

- 229 Sofen, H., O'Toole, C.
Anti-squamous tumor antibodies in patients with
squamous cell carcinoma.
Cancer Res. 38:199, 1978
- 230 Svenberg, T.
Carcinoembryonic antigen-like substances of
human bile. Isolation and partial characterization.
Int. J. Cancer, 17, 588-596, 1976
- 231 Schettler G.
Thieme-Verlag
Innere Medizin, 1980
- 232 Schlipköter, H.W., Idel, H., Barsoum, A.L., Vollmer, U.J.
Tumorcharakteristische Antigene im Bronchial-
karzinom (Teil 1)
I. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 158:109, 1973
- 233 Schlipköter, H.W., Feyerabend, P., Koenen, K., Idel, H.
Tumorcharakteristische Antigene beim Bronchial-
karzinom (Teil II)
Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzstärke
von histologischen Schnitten.
Quelle: siehe oben, aber 159, 526-538, 1974
- 234 Theriault, L, Page, M.,
A solid-phase enzyme immunoassay for serum
ferritin.
Clin. Chem. 23, 2142, No 11, 1977
- 235 Travis, J., Garner, D., Bowen, J.
Human alpha-1-antichymotrypsin: purification
and properties.
Biochemistry 17:5647-5651, 1978

- 236 Travis, J., Bowen, J., Baugh, R.
Human alpha-1 antichymotrypsin: interaction
with chymotrypsin-like proteinases.
Biochemistry 17, 5651-5656, 1978
- 237 UICC, Technical Report Vol 56, Chapter 18
Manual of Cancer Chemotherapy 3rd Edition
Geneva 1981, UICC
- 238 Veltri, R.W., Mengoli, H.F., Maxim, P.E., Westfall, S.,
Gopo, J.M., Huang, C.W., Sprinkle, P.M.
Isolation and identification of human lung tumor-
associated antigens.
Cancer Res. 37, 1313-1322, 1977
- 239 Veltri, R.W., Maxim, P.E., Boehlecke, J.M.
A human tumor-associated membrane antigen from
squamous-cell carcinoma of the lung.
Brit. J. Cancer 41:705-715, 1980
- 240 Venge, P., Fousard, T., Henriksen, J., Hakansson, L.,
Kreuger, A.
Serum-levels of lactoferrin, lysozyme and
myeloperoxidase in normal, infection-prone and
leukemic children.
Clin. Chim. Acta 136 (2-3): 121-130, 1984
- 241 Vincent, R.G., Chu, T.M.,
CEA in patients with carcinoma of the lung.
J. Thor. Cardiovasc. Surg. 66, 320-328, 1973
- 242 Vincent, R.G., Chu, T.M., Gutierrez, A.C., Stegemann, P.J.,
Madajewicz, S.
Carcinoembryonic Antigens as a monitor of successful
surgical resection in 130 Patients with carcinoma
of lung.
J. Cardiovasc. Surg. 75:734, 1978

- 243 Vincent, R.G., Chu, R.M., Lane, W.W.
The value of carcinoembryonic antigen in patients
with carcinoma of the lung.
Cancer 44:685-691, 1979
- 244 Viza, D., Louvier, M., Phillips, J., Boucheix, C.,
Guerin, R.A.
Solubilization of an antigen associated with
certain bronchial tumors.
Europ. J. Cancer, 11:765-770, 1975
- 245 Volpino, P., Cangemi, V., Caputo, V., Mazzarino, E.,
Galati, G.
Clinical usefulness of serum ferritin measurements
in lung cancer patients.
J. Nucl. Med. All. Sci. 28 (1), 27-30, 1984
- 246 Waalkes, T.Ph., Abeloff, M.D., Woo, K.B., Ettinger, D.S.,
Ruddon, R.W., Aldenderfer, P.
Carcinoembryonic antigen for monitoring patients
with small-cell carcinoma of the lung during
treatment.
Cancer-Res. 40:4420-4427, 1980
- 247 Waalkes, T.Ph., Abeloff, M.D., Ettinger, D.S., Woo, K.B.,
Gehrke, C.W., Kuo, K.C., Borek, E.
Biological markers and small-cell carcinoma of
the lung. A clinical evaluation of urinary
ribonucleosides.
Cancer 50:2457, 1982
- 248 Wahren, B., Gahrton, G., Hammarström, S.
Nonspecific cross-reacting antigen in normal and
leukemic myeloid cells and serum.
Cancer Res. 40:2039-2044, 1980

- 249 Wahren, B., Gahrton, G., Ruden. U., Hammarstrom, S.,
Clinical evaluation of NCA in patients with
chronic myelocytic leukemia.
Intern. J. Cancer 29:133-137, 1982
- 250 Walters, G.O., Miller, F.M. Wordwood, M.
Serum ferritin concentration and iron stores
in normal subjects.
J. Clin. Pathol. 26, 770, 1973
- 251 Wanebo, H.J., Rao, B., Miyazawa, N., Martini, N.,
Middleman, M.P., Oettgen, H.F., Beattie, E.J.
Immune reactivity in primary carcinoma of the
lung and its relation to prognosis.
J. Thor. Cardiovasc. Surg, 72:339, 1976
- 252 Watanabe, N., Niitsu, Y., Ohtsuka, S., Koseki, J.,
Kohgo, Y., Uruskizaki, I., Kato, K., Ishikawa, E.
Enzyme immunoassay for human ferritin.
Clin. Chem. 25:80-82, 1979
- 253 Watson, R.D., Smith, A.G., Levy, J.G.
The use of immunoadsorbent columns for the
isolation of antibodies specific for antigens
associated with human bronchogenic carcinoma.
Brit. J. Cancer 29:183, 1974
- 254 Watson, R.D., Smith, A.G., Levy, J.G.
The detection by immunodiffusion of tumor
associated antigenic components in extracts
of human bronchogenic carcinoma.
Brit. J. Cancer, 32:300-308, 1975
- 255 Weichselbaum, T.E.
An accurate and rapid method for the determi-
nation of protein in small amounts of blood
serum and plasma.
Am. J. Clin. Path. 10,40, 1948

- 256 Wetz, K., Crichton, R.R.
Ferritin: Struktur und medizinische Aspekte -
Zusammenfassender Bericht.
Blut, Band XXVII, 275-283, 1973
- 257 Wilde, J.
Screening for lung cancer
Arch. f. Geschwulstforschg. 48:74, 1978
- 258 Winkelmann, W., Deuss, U., Allolio, B., Hummerich, W.
Kaulen, K., Brosch, H., Guyot, A., Arnold, C.
Adrenocorticotropin, calcitonin and antidiuretic
hormone as tumor markers in patients with broncho-
genic carcinoma of various histological types.
Klin. Wschr. 62 (21): 1018-1024, 1982
- 259 Wolf, A., Micksche, M., Bauer, H.
An improved antigenic marker of human lung
carcinomas and its use in radioimmunoassays.
Br. J. Cancer 43:267-275, 1981
- 260 Woo, K.B., Waalkes, T.P., Abeloff, M.D., Ettinger, D.S.
McNitt, K.L., Gehrke, C.W.
Multiple biologic markers in the monitoring of
treatment for patients with small cell carcinoma
of the lung: the use of serial levels of plasma
CEA and serum carbohydrates.
Cancer 48:1633-1642, 1981
- 261 Woo, K.B., Waalkes, T.P., Abeloff, M.D., Lenhard, R.E.,
Gehrke, C.W., Kuo, K.C.
Urinary polyamines for evaluating the course
of disease for patients with small cell carcinoma
of the lung.
Cancer 52 (9):1684, 1983

- 262 Worwood, M., Dawkins, S., Wagstaff, M., Jacobs, A.
The purification of ferritin from human serum.
Biochem. J. 157, 97-103, 1976
- 263 Yachi, A., Matsuura, Y., Carpenter, C.M., Hyde, L.
Immunochemical Studies on Human Lung Cancer
Antigens Soluble in 50% Saturated Ammonium
Sulfate.
J. Natl. Cancer Inst. 40:663-682, 1968
- 264 Yamada, T., Iwa, T., Kurata, Y., Okada, S.
Extraction and preliminary characterization of
tumor antigens in human bronchogenic adeno-
carcinoma and squamous cell carcinoma.
Europ. J. Cancer 26:781-792, 1980
- 265 Yasumoto, K., Manabe, H., Ueno, M., Ohta, M., Ueda, H.,
Jida, A., Nomoto, N., Azuma, I., Yamamura, Y.
Immunotherapy of human lung cancer with BCG-
Cellwall-skeleton.
Gann 67:787, 1976
- 266 Yoda, Y., Gasa, S., Makita, A., Fujioka, Y., Kikuchi, Y.,
Hashimoto, M.
Glycolipids in human lung carcinoma of histolo-
gicoly different types.
J. Natl Cancer Inst. 63:1153-1159, 1979
- 267 Yoshino, Y., Hirai, Y., Aoki, T., Morita, T., Eguchi, Y.,
Yajima, Kagawa, Y.,
Serum ferritin concentration and isoform pattern detected by immunoradiometric assay.
J. Nutr. Sci. Vitaminol. 26:87-97, 1980
- 268 Zähringer, J.
Struktur und Funktion von Ferritin
Zusammenfassung der Referate. S. 1 - 24, In I.P.
Kaltwasser; E. Werner "Serumferritin", Springer-
Verlag Berlin Heidelberg, New York 1980

5. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Klinik II Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. G. Paumgartner) durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Paumgartner und Herrn Prof. Dr. R. Lamerz darf ich für die Überlassung des Themas, des Institutsmaterials sowie für die Benutzung der Institutsseinrichtungen und die Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit herzlich danken.

Besonders danken möchte ich auch dem ehemaligen Leiter der Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Harlaching, Herrn Professor Dr. E. Kugel, und seinem Oberarzt, Herrn Dr. H. Henneke, für die Überlassung von Operationsresektaten sowie dem ehemaligen Leiter der Pathologie-Abteilung am Städt. Krankenhaus Harlaching, Herrn Prof. Dr. E. Stampfl, und seinem Oberarzt, Herrn Dr. G. Horka, für die histologischen Auswertungen der Operationsresektate.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. R. Lamerz für die Hilfe und vielseitigen Anregungen bei der labortechnischen Durchführung und Abfassung dieser Arbeit sowie auch den Medizinisch-technischen Assistentinnen Frau A. Brandt und Frau E. Segura für ihre tatkräftige Unterstützung bei der technischen Durchführung der Laborarbeiten.

6. Lebenslauf

Am 20. Dezember 1950 wurde ich als Sohn des Maschinisten Rudolf Girg und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Dietl, in Simbach am Inn geboren.

Nach dem Besuch von fünf Klassen Volksschule in Ering am Inn folgten neun Jahre am Tassilo-Gymnasium in Simbach am Inn, wo ich den neusprachlichen Zweig belegte. Am 19. Juni 1971, nach bestandenen Abitur, verließ ich das Gymnasium und studierte im Wintersemester 1971/72 Psychologie an der Universität Regensburg.

Hierauf erfüllte ich mit dem Zivildienst in den Jahren 1972 und 1973, zuerst in einer Kuranstalt in Oberstaufen im Allgäu, dann in einem Jugendhof in Kirchseeon für lern- und geistigbehinderte Lehrlinge, meine Pflicht als Staatsbürger.

Vom Wintersemester 1973 bis zum Sommersemester 1979 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Humanmedizin. Im Herbst 1978 begann ich meine Ausbildung im Praktischen Jahr.

Die einzelnen Stationen waren:

Innere Medizin und Chirurgie im Städtischen Krankenhaus Landshut bei Professor Dr. Köhler und bei Professor Dr. Hueck; Frauenheilkunde und Geburtshilfe in der II. Frauenklinik der Universität München unter der Leitung von Professor Dr. Richter.

Nach erfolgreichem Abschluß der schriftlichen und mündlichen Prüfung zum dritten Staatsexamen und der Erfüllung aller anderen Voraussetzungen erhielt ich am 3. Dezember 79 die Approbation als Arzt.

Von Dezember 1979 bis September 1982 war ich Assistenzarzt auf der inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Simbach am Inn bei Herrn Chefarzt Dr. Gemen, anschließend auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Eggenfelden bei Herrn Chefarzt Dr. Schmück bis September 1984, es folgten drei Monate Assistentenzeit in der Allgemeinpraxis von Herrn Dr. A. Wolf, welche ich am 01.01.1985 übernommen habe.

Seither bin ich tätig in eigener Praxis in Ering am Inn.

Am 27. Februar 1985 erhielt ich die Anerkennung als Arzt für Allgemeinmedizin, dazu die Anerkennung für Sportmedizin im Oktober 1985.

